

**Univerzita Karlova v Praze  
1. lékařská fakulta  
Psychiatrická klinika**

Studijní program: PhD studia  
Studijní obor: Psychologie a psychopatologie



Mgr. Deborah Kaminská

**Anorexia nervosa – vybrané genetické determinanty  
a endofenotypy**

**Anorexia nervosa – selected genetic determinants  
and endophenotypes**

Disertační práce

Školitel:

Prof. MUDr. Hana Papežová, CSc

**Praha, 2013**

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím/Nesouhlasím\* s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 26. 07. 2013

Deborah Kaminská

**Identifikační záznam:**

KAMINSKÁ, Deborah. *Anorexia nervosa – vybrané genetické determinanty a endofenotypy [Anorexia nervosa – selected genetic determinants and endophenotype]*. Praha, 2013. 116 s., 3 příl. Disertační práce (PhD). Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Psychiatrická klinika. Vedoucí práce Papežová, Hana.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chci poděkovat v první řadě své školitelce prof. MUDr. Haně Papežové, CSc. za pečlivé a laskavé vedení a trpělivost v průběhu celého doktorského studia. Její obětavý přístup k nemocným je a bude pro mne inspirací v další práci. Děkuji Lence Šlachtové, MSc. za vynikající spolupráci v průběhu sběru i zpracovávání výsledků. Můj dík patří i laborantce paní Aleně Puchmajerové za její zájem o moji práci, nezištnou pomoc a vedení při osvojování si základních technik molekulární biologie. Chci také poděkovat sestrám 3. oddělení Psychiatrické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze, především Markétě Linhartové, Kateřině Bártové a Haně Šimůnkové za nevšední zájem a nasazení nad rámec svých služebních povinností při odběrech a zpracování dat nemocných s poruchami příjmu potravy. Můj dík dále patří odborným spolupracovníkům, Prof. MUDr. Pavlu Martáskovi, DrSc; MUDr. Davidu Kemlinkovi, PhD; PhDr. Martinu Chvalcovi, PhD; Mgr. Daniele Záhorakové, PhD a Mgr. Lubomíru Králíkovi. Děkuji rovněž Grantové agentuře Univerzity Karlovy v Praze za poskytnutí prostředků v rámci řešení grantu GAUK 27/2006 .

## Obsah:

<b>SOUHRN .....</b>	<b>5</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>6</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>7</b>
<b>1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY PORUCH PŘÍJMU POTRAVY .....</b>	<b>8</b>
1.1. Poruchy příjmu potravy .....	9
1.2. Základní charakteristika .....	9
1.3. Studium genetických determinant poruch příjmu potravy .....	10
<b>2. CÍLE .....</b>	<b>21</b>
<b>3. HYPOTÉZY .....</b>	<b>23</b>
<b>4. METODIKA .....</b>	<b>25</b>
4.1. Nemocní a kontrolní skupina .....	26
4.2. Dotazníky .....	27
4.3. Metody molekulárně-genetické .....	31
4.4. Vlastní metodiky .....	31
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>37</b>
5.1. Publikace 1: Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies. ....	39
5.2. Publikace 2: Stress perception and (GT) <sub>n</sub> repeat polymorphism in HO-1 gene are both risk factors in eating disorder development. ....	55
5.3. Publikace 3: Genetické aspekty poruch příjmu potravy. ....	72
<b>6.SOUHRN VÝSLEDKŮ DIZERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>78</b>
<b>7.PŘEDPOKLADY PRO ROZVOJ DISCIPLINY A VÝHLEDY DO BUDOUCNA ...</b>	<b>91</b>
<b>8. PUBLIKAČNÍ ČINNOST .....</b>	<b>95</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>99</b>
<b>10. PŘÍLOHY .....</b>	<b>117</b>

## Souhrn

Anorexia nervosa (AN) a bulimia nervosa (BN) jsou choroby se značnými individuálními odchylkami. Genetické pozadí hraje důležitou roli v náchylnosti ke vzniku a závažnosti onemocnění. Pro vyhodnocení vztahu mezi genetickými faktory a subtypy onemocnění jsme použili genotypizaci a zároveň analýzu vývoje vybraných klinických parametrů. Sledovali jsme skupinu 75 pacientů s AN (1. studie), 127 pacientů s AN a BN (2. studie), diagnostikovaných podle DSM-4 a MKN-10 a přispěli do souboru GWAS, který čítá 2907 pacientek s AN. Výsledky 1. studie podporují asociaci polymorfismu -1438G/A v serotoninovém receptoru 5-HT<sub>2A</sub> s onemocněním AN a přinášejí srovnání s jinými studiemi pomocí metaanalýzy. U dalších polymorfismů odpovědných za neurotransmisi serotoninu (serotoninový transportér 5-HTT: polymorfismus LPR a VNTR) tato studie nastínila odlišný trend asociace LPR s onemocněním AN u české populace než ostatní publikované studie. U 5-HTT VNTR polymorfismu nebyla pozorována žádná asociace. 2. studie se zabývala vlivem hemoxygenázy-1 (zásadní protektivní faktor při metabolickém stresu) na poruchy příjmu potravy v interakci s enviromentálními vlivy. Zkoumali jsme rizika pro AN a BN založená na genetických lokusech, odpovědných za zvýšenou náchylnost k onemocnění i přidaný efekt environmentálních rizikových stresových faktorů.

**Klíčová slova:** Anorexia a bulimia nervosa – genotypizace – endofenotypy – enviromentalní stresové faktory - serotonin – hemoxygenáza-1 – asociační studie

## **Summary**

Anorexia Nervosa (AN) and Bulimia Nervosa (BN) are diseases with considerable individual variation. Genetic background plays an important role in disease susceptibility and severity. To evaluate the relationship between certain genetic loci and diseases subtypes we genotyped and analysed evolution of selected clinical parameters. We investigated a group of 75 patients with AN (1. study), 127 DSM-4 and ICD-10 diagnosed patients with AN and BN (2. study), and contributed to sample of 2907 AN patients in large GWAS study. Results from the 1st study support association of polymorphism -1438G/A in serotonin receptor 5-HT<sub>2A</sub> with AN and compare the results from other studies with metaanalyses. In next, polymorphism responsible for the serotonin neurotransmission (serotonin transporter 5-HTT, polymorphisms LPR and VNTR) the study shows different association trend of LPR with AN in Czech population compared to other studies. 5-HTT VNTR polymorphism had no observed association. The second study investigated the role of hemeoxygenase 1 (plays a pivotal role in metabolic stress protecting cells) in eating disorders, in interaction with enviromental stress. We investigated the usefulness of an aggregate measure of the risks of AN and BN that is based on genetic susceptibility loci and the added effect of environmental stress risk factors.

## **Key words**

Anorexia and Bulimia Nervosa – Genotypization – Endofenotypes – Enviromental Stress Factors - Serotonin – Heme oxygenase-1 – Association studies

## Seznam použitých zkratk

**AN**, anorexia nervosa

**BN**, bulimia nervosa

**EDTA**, ethylene diamine tetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová

**BMI**, body mass index, podíl tělesné hmotnosti (kg) a druhé mocniny výšky (m<sup>2</sup>)

**DNA**, deoxyribonukleová kyselina

**PCR**, polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

**RFLP**, restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restrikčních fragmentů, metoda DNA analýzy

**SD**, standard deviation score, skóre směrodatné odchylky

**5-HT**, 5-hydroxytryptamin, serotonin

**5-HTT**, serotoninový transportér

**5-HT2A**, serotoninový receptor 2A

**ED**, eating disorders

**PPP**, poruchy příjmu potravy,

**LPR**, linked polymorphic region,

**VNTR**, variable number of tandem repeats,

**OR**, odds ratio

**SNP** – single nucleotide polymorphism, záměna jednoho nukleotidu

**GWAS** – genome wide association study, celogenomová asociační studie

**BDNF** – brain derived neurotrophic factor – neurotrofní faktor mozku

**HO-1** – hemoxygenáza-1

**bp** – base pair, páry bazí v DNA

# **1. ÚVOD DO PROBLEMATKY PORUCH PŘÍJMU POTRAVY**



## **1.1. Poruchy příjmu potravy**

Mentální anorexie (AN) a bulimia nervosa (BN) i psychogenní přejídání (BED) jsou závažné poruchy ze spektra poruch příjmu potravy (PPP) s abnormálním jídelním chováním, hladověním a/nebo přejídáním, purgativními, kompenzačními mechanismy a poruchou vnímání vlastního těla (DSM-IV i ICD-10). Příčiny jejich vzniku jsou multifaktoriální. Při dlouhodobém průběhu (v průměru 6 let) se postupně rozvíjejí vážné následky somatické, psychiatrické i sociální, které vyžadují komplexní znalosti i léčbu.

## **1.2. Základní charakteristika**

Anorexia nervosa (AN) reprezentuje nejzávažnější psychiatrické onemocnění ze spektra poruch příjmu potravy, je charakterizována patologickým jídelním chováním s neschopností udržet normální, zdravou tělesnou hmotnost. AN se převážně vyskytuje u žen a je charakterizována restrikcí příjmu potravy (u resktriktivní formy) a purgativním chováním (u formy purgativní), obsedantním strachem z nadváhy, patologickým vnímáním vlastního těla (body image) a dalšími mnohočetnými somatickými, hormonálními, psychologickými a sociálními komplikacemi (Fairburn and Harrison, 2003). Váha je udržována nejméně 15 % pod očekávanou (buď ztracenou nebo nikdy nedosaženou) hmotností, nebo Queteletův body-mass index je 17,5 nebo méně. Prepubertální pacienti nedosahují očekávaného nárůstu hmotnosti v období růstu. Ztrátu hmotnosti si navozuje pacient sám dietami, vyhýbáním se "kalorickému jídlu, které vede k tloustnutí" a/nebo jedním či více dalšími purgativními mechanismy: navozovaným zvracením, excesivním

cvičením, užíváním látek potlačujících chuť k jídlu a/nebo projímadly a diuretiky.

Změněné vnímání vlastního těla u nemocných s AN reprezentuje specifickou psychopatologii: s narůstající podvýživou, přetrvává pocit pacienta, že je příliš silný. Typická je i velmi nízká cílová hmotnost. AN také vede k endokrinní poruše hypotalamo-hypofyzární-nadledvinové osy, charakterizované amenoreou u žen, často "maskovanou" hormonální substituční terapií a u mužů ztrátou sexuálního zájmu a potence. Zvýšené hladiny růstového hormonu, kortisolu a snížení hladin tyroidálních hormonů a abnormality v sekreci inzulinu jsou také typické. Zpoždění nebo zastavení pubertálních změn (růst, rozvoj prsou a genitálií) je patrné pacientů prepubertálních (ICD-10,2004, DSM-IV-TM 2000).

### **1.3. Studium genetických determinant poruch příjmu potravy**

Genetický výzkum obvykle začíná hledáním zvýšeného výskytu určitého znaku onemocnění v rodinách. Nejinak tomu bylo i v hledání genetických determinant (predispozic) u poruch příjmu potravy (dále PPP). Již v sedmdesátých letech Theander (1970) publikoval studii, kde 6,6 % sourozenců u 94 sledovaných pacientek s AN trpělo tímž onemocněním. O 10 let později Crisp et al. (1980) zjistil pravděpodobný výskyt AN u matky v anamnéze u 14 % pacientek s diagnózou PPP. V 90. letech Strober et al. (1990) upozornil, že v jeho souboru trpělo AN 6,2 % matek sledovaných pacientek s AN a 2 % jejich sester. Dle Hsu (1990) se v rodinách pacientek s AN a BN vyskytují poruchy příjmu potravy pětikrát častěji, než v běžné populaci.

Studie rodin mohou ovšem nejvýše ukázat, že daný znak se vyskytuje častěji u příbuzných než v kontrolní populaci. To ale není důkazem genetického původu.

Podobnost příbuzných může mít i negenetické příčiny – vlivy prostředí - např. infekce, dieta, kulturní zvyky, stresové faktory, apod.

### 1.3.1. Studie dvojčat

Naproti tomu ze studií dvojčat nebo z adopčních studií je již možné činit závěry o genetických vlivech. Ve studiích dvojčat se obvykle srovnává shoda (konkordance) sledovaného znaku u jedno a dvouvaječných párů. Při předpokladu shodných vlivů prostředí u obou typů párů jsou rozdíly v konkordanci vysvětlovány genetickými faktory. Jednovaječná dvojčata sdílejí všechny geny, dvouvaječná polovinu. Zatímco jednovaječná dvojčata mají tedy stejnou genetickou výbavu, dvouvaječná dvojčata jsou geneticky stejně odlišná jako ostatní sourozenci. Srovnání výskytu určité poruchy u jedno a dvouvaječných dvojčat pak ukazuje na podíl genetických faktorů.

Tabulka č. 1  
(upraveno podle Uher, 2009)

#### Genetická epidemiologie vybraných typů psychických onemocnění

	<u>Prevalence</u>	<u>Nástup onem.</u>	<u>Mortalita</u>	<u>Heritabilita</u>
Autismus	0,30	1	2,0	0,90
<b>Anorexia nervosa</b>	<b>0,60</b>	<b>15</b>	<b>6,2</b>	<b>0,56</b>
Schizofrenie	0,70	22	2,6	0,81
Bipolární afektivní porucha	1,25	25	2,0	0,85
Unipolární deprese	10,22	32	1,8	0,37
Úzkostná porucha	28,80	11	1,2	0,32

*Celoživotní prevalence (v %), průměr nástupu onemocnění (roky), mortalita (poměrná hodnota, hodnoty větší než jedna ukazují zvýšenou úmrtnost ve srovnání s běžnou populací), heritabilita (odhadovaný přínos genetických vlivů stanovených studiemi dvojčat)*

Holland et al. (1984) a kolegové informovali, že ze 30 párů dvojčat ženského pohlaví v Londýně trpělo AN 9 ze 16 (56 %) monozygotních párů, 1 ze 14 (7 %) dizygotních párů. Tři z neanorektických sourozenců měli jinou psychickou poruchu. Výskyt poruch příjmu potravy (PPP) se většinou pohyboval mezi 25-50 % u jednovaječných a kolem 10 % u dvouvaječných dvojčat. Hsu (1990), který sledoval šest jednovaječných a dva dvouvaječné páry, zjistil PPP u dvou jednovaječných dvojčat. Fichter a Noegel (1980) však prokázali BN jen u jedné dívky z 27 párů dvojčat, kde jedno z dvojčat trpělo PPP. Podle nich jednovaječná dvojčata projevují zvýšenou genetickou vulnerabilitu pro PPP, ale současně i pro jiné duševní poruchy, například pro depresi.

Water a Beumont (1990) nezjistili PPP u žádného ze sourozenců z jedenácti dvouvaječných a jednovaječných dvojčat trpících AN. \_\_Studie rodin a především dvojčat potvrzují, že PPP jsou familiárním onemocněním s genetickým podílem (Bulik et al., 2000; Martásková a Papežová, 2005). Heritabilita u PPP (Bulik a Tozzi, 2004) se pohybuje v rozmezí 33-84 % u anorexia nervosa a 28-83 % u bulimia nervosa.

### **1.3.2. Studie rodin**

Systematické studium genetických komponent u PPP se soustředilo nejen na studie dvojčat v souvislosti s tímto onemocněním, ale i na výskyt jiných psychiatrických poruch v rodinách nemocných. Množství genetických faktorů je sdíleno nejen různými variantami PPP, ale taktéž dalšími psychickými poruchami (LaPorte et al., 2008; Papežová, 1997). Ještě častěji než PPP se v rodinách pacientů s AN a BN vyskytují různé afektivní poruchy. Proto Hudson a kol. (1983) dokonce vyslovili hypotézu, že BN je variantou afektivní poruchy. Podle Hsu (1990) je deprese v rodinách pacientek s AN třikrát častější než v běžné populaci. Alkoholismus rodičů

v souvislosti s rozvojem poruchy uvedlo 24 % pacientek, 4 % z kontrolní skupiny (Krch, 1999). DiNicola (1990) diagnostikoval depresivní symptomatiku u pacientů s PPP v rozmezí 25-75 %. Osobnost pacientek s AN bývá charakterizována (Kocourková et al., 1997) jako svědomitá, snaživá, pečlivá, perfekcionistická. Bývá kladena otázka, zda není jídelní patologie manifestací primární obsedantně – kompulzivní poruchy, stejně tak jako není-li možné obsedantní symptomatiku pokládat za následek procesů hladovění. Obsedantní rysy našla ve svých souborech většina autorů. Je uváděno až 37 % pacientů s PPP, kteří splnili kritéria pro obsedantně – kompulzivní poruchu (Kocourková et al., 1997).

Jsou hledány fenotypy, které povedou k identifikaci jednotlivých oblastí genů, jež se u AN a BN uplatňují. Dosud byly studovány neuropeptidy, indolaminy, katecholaminy, melanokortin, neuropeptid Y, transportér norepinefrinu, leptin, opiody a řada dalších. Tyto studie ovšem dosud nebyly opakovány s konzistentními výsledky (Sherag et al., 2010, Kontis and Theochari, 2012).

Některé asociační studie poukazují na existenci „susceptibility loci“ na chromozomu 10 pro BN a chromozomu 1 pro AN (Bergen et al., 2003; Bulik a Tozzi, 2004). Celogenomové asociační studie vedou k odhalení nových kandidátních genů. Záleží však na heterogenitě studovaných skupin, jsou-li výsledky replikovány (Kas et al., 2008; Root et al., 2011).

### **1.3.3. Role serotoninu**

Při studiu PPP se stále více zaměřuje pozornost na roli serotoninu. Tento neurotransmitter se účastní mnoha fyziologických procesů včetně ovlivnění chuti, spánku, nálady či bolesti (Gordwood et al., 2003; Murphy et al., 2008; Kaye et al., 2008). Serotoninergní systém ovlivňuje nálady, vnímání, cirkadiální a

neuroendokrinní rytmy včetně příjmu potravy a spánku. V kontextu příjmu potravy serotonin zprostředkovává pocit sytosti a částečně reguluje příjem sacharidů (Kocourková et al., 1997). BN je spojována s deficitem serotoninergní aktivity v CNS, následného oslabení pocitu sytosti a záchvaty přejídání. Tímto zjednodušeným mechanismem lze částečně vysvětlit pozitivní výsledky léčby SSRI (serotonin reuptake inhibitors) u tohoto onemocnění. AN je naopak spojena se zvýšenou senzitivou nebo zvýšenou koncentrací serotoninu, následným omezením příjmu jídla a poklesu tělesné hmotnosti.

Serotonin je syntetizován z tryptofanu. Dlouhodobé hladovění může vést ke snížení množství potravou přijatého tryptofanu. Tryptofanová deplece redukuje serotoninovou syntézu a dostupnost serotoninu v mozku. Aktivita serotoninu je ukončena jeho zpětným vychytáváním (reuptake) serotoninovým transportním proteinem. Polymorfismus LPR (length polymorphic region) v genu pro serotoninový transporter se nachází v regulační oblasti genu pro serotoninový transportér. Je charakterizován variantními repetitivními elementy a funkční studie jednotlivých variant dokumentují vliv na expresi serotoninového transportéru. (Heils et al., 1996). Repetitivní sekvence genu (LPR, VNTR) 5-HTT působí jako represory promotorové aktivity a alelické varianty vykazují různou míru exprese serotoninového transportéru. Tím se mohou modulovat komplexní znaky a chování (Heils et al., 1996) i u poruch příjmu potravy. Serotoninový transportér 5-HTT vykazuje LPR polymorfismus s S či L (short/long) genotypem v promotorové oblasti genu serotoninového transportéru, přičemž právě tento polymorfismus může být spojen s účinností antidepresiv. Rozdílnost v odpovědi jednotlivých pacientů na medikaci a závažnosti nežádoucích účinků může být tedy ovlivněna genetickou dispozicí. Caspi et al. (2003) spojuje

přítomnost S alely s častější diagnosou deprese a vyšší incidencí suicidia. Murphy (2004) pozoroval u depresivních pacientů s S alelou nižší účinnost fluvoxaminu a paroxetinu, u paroxetinu také vyšší výskyt nežádoucích účinků. Naopak Kim et al. (2000) zaznamenal lepší odpověď na antidepresivní léčbu u korejských pacientů. Minov et al. (2001) nezjistil žádný vliv polymorfismu na reakci 104 pacientů léčených mnoha odlišnými způsoby antidepresivní léčby. Čtyři studie zaměřené na rozšíření S alely promotorové oblasti genu pro serotoninový transportér u pacientů s AN (Di Bella et al., 2000; Fumeron et al., 2001; Hinney et al., 1984; Sundaramurthy et al., 2000) odhalily vyšší výskyt S alely u pacientů než u kontrol ve všech čtyřech případech. Statisticky signifikantní spojitost mezi S alelou a AN odhalila ovšem pouze jedna studie. S alela promotorové oblasti genu pro serotoninový transportér snižuje transkripční aktivitu a vede k nižší expresi serotoninového transportéru (Heils et al., 1996). Touto cestou se očekává ovlivnění efektu SSRI u PPP. Objasnění individuálně odlišné vnímavosti a odpovědi na léčbu, která je způsobena genetickými faktory predisponujícími jedince k odlišnostem v metabolismu léčiva, mohou v budoucnosti umožnit lepší využití medikamentů včetně SSRI. Genetický polymorfismus serotoninového transportéru může ovlivnit množství fenotypových projevů včetně anxiety, afektivních poruch a poruch PPP. Varianta S serotoninového transportéru byla rovněž studována v souvislosti s úbytkem šedé hmoty v limbické oblasti či odlišné reakci na emoční stres (Heinz et al., 2005)

Polymorfismus LPR (length polymorphic region) v genu pro serotoninový transportér se nachází v regulační oblasti genu pro serotoninový transportér. Je charakterizován variantními repetitivními elementy a funkční studie jednotlivých variant dokumentují vliv na expresi serotoninového transportéru. (Heils et al., 1996).

Dalším ze studovaných článků serotoninergní metabolické dráhy a jedním z prvních kandidátních genů poruch příjmu potravy je serotoninový receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Hinney et al., 1997). Velký zájem vzbudila asociace polymorfizmu -1438G/A s rizikem vzniku onemocnění AN, což bylo potvrzeno několika metaanalýzami (Gordwood et al., 2003; Martásková et al., 2009, studie 1, tato dizertace). Kromě významně častějšího výskytu alely A u pacientek s AN ve srovnání s kontrolami, byl polymorfizmus -1438G/A pozorován jako modulátor asociovaný s pozdějším věkem nástupu onemocnění.

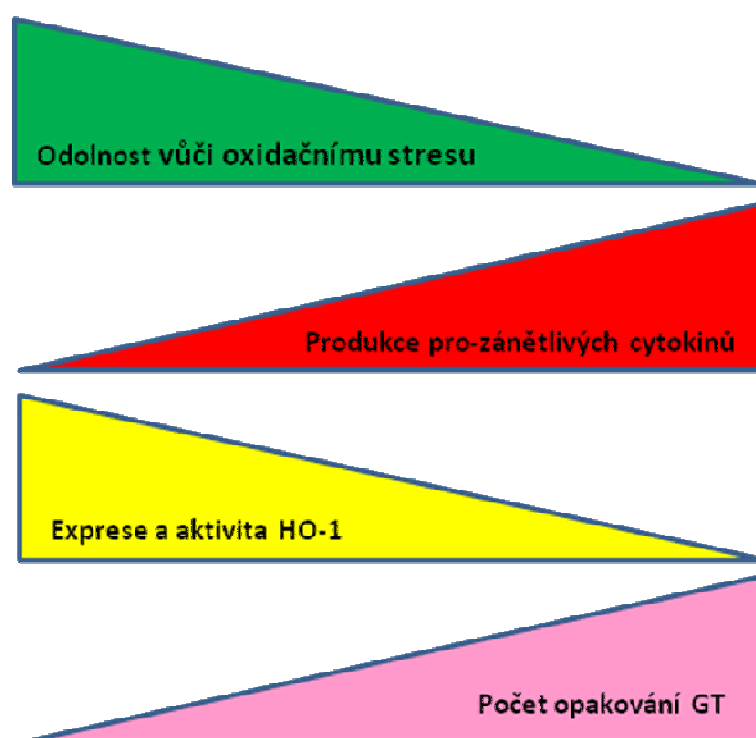
#### **1.3.4. Hemoxygenáza-1**

Hemoxygenáza 1 (HO-1, někdy také HMOX-1) je klíčovým enzymem degradace hemu, katalyzuje oxidativní změnu hemu na biliverdin, Fe<sup>2+</sup> a CO. Následná rychlá přeměna biliverdinu na bilirubin je katalyzována biliverdinreduktázou, která je vždy přítomna v nadbytku. HO-1 je tedy jediným enzymem, který kontroluje výši produkce bilirubinu (Tenhunen et al., 1968; Abraham and Kappas, 2008). Kromě role, kterou tento enzym hraje tím, že katalyzuje degradaci hemu, produkty této reakce (CO, biliverdin, bilirubin) jsou velmi důležité v procesu udržování buněčné homeostázy a regulaci buněčného metabolismu (Shibara et al., 1987). HO-1 je exprimována v řadě metabolicky aktivních tkání a účastní se antioxidačních, antiproliferativních a protizánětlivých procesů s jedním společným cílem, chránit buňku proti oxidativnímu stresu (Abraham and Kappas, 2008; Tenhunen et al., 1969; Grochot-Przeczek et al., 2012; Exner et al., 2004; Exner et al., 2006; Poss and Tonegawa, 1997).

HO-1 je gen s vysokou mezidruhovou podobností a je vysoce exprimován v játrech a slezině. Vysoká exprese genu HO-1 je účinným prostředkem v regulaci řady kaskád



produkty degradace hemu; signální molekula CO se účastní kontroly produkce zánětlivých působků modulací MAPK, JNK, transkripčního faktoru AP-1 a nukleárního faktoru NF-kB (Megias et al., 2007; Megias et al., 2009; Otterbein et al., 2000). Dosud byly popsány tři funkční polymorfizmy v genu pro HO-1, Nejvíce pozornosti je věnováno výše uvedenému polymorfizmu s GT opakováním (Hirai et al., 2003).



**Obrázek 1:** Polymorfismus v promotoru genu pro hemeoxygénázu-1 a jeho důsledky (upraveno dle Grochot-Przeczek et al., 2012).

### **(GT)*n* polymorfismus**

V promotéru genu ro HO-1 je polymorfní místo s různým množstvím opakujících se následných sekvencí dvojice nukleotidů GT. Toto místo je lokalizováno přibližně 250 bazí před transkripčním začátkem v počtu 12 až 40 opakování. *In vitro* studie ukazují snižující se transkripční aktivitu variant s narůstajícím počtem GT opakování (alela

L), která je naopak nejvyšší u varianty s krátkým GT opakováním (alela S). Takto je ovlivněna odpověď na oxidativní stres (viz Obr. 1). (Chen et al., 2002; Yamada et al., 2000; Taha, et al., 2010). Existuje několik klasifikací, kdy nejčastějšími alelami jsou alely s počtem opakování 23 a 30 (Baan et al., 2004; Schillinger et al., 2004; Yamada et al., 2000).

### **1.3.5. BDNF**

Gen pro BDNF kóduje důležitý neurotrofní faktor, který hraje podstatnou úlohu v synaptické plasticitě a vývoji neuronů (Thoenen, 1995). Na myším modelu bylo prokázáno, že histamin zvyšuje obsah BDNF v hypothalamu (Gotoh et al., 2013). Varianta Val66Met v genu pro BDNF byla asociována s AN a BN v osmi různých evropských populacích (Ribases et al., 2005). Tyto nálezy nebyly potvrzeny v japonské populaci (Ando et al., 2012). Mercader se spolupracovníky (2007) popsali, že koncentrace BDNF v krvi je u nemocných s AN a BN asociována s genetickou variabilitou genu pro BDNF. Dvě rozsáhlé studie v britské ženské populaci prokázaly vazbu mezi BDNF polymorfismem Val66Met a BMI (Shugart et al., 2009).

### **1.3.6. Vnímání stresu a jeho dědičnost**

Současné výzkumy podporují úlohu celoživotního těžkého stresu a traumat ve vývoji, průběhu a relapsu PPP (Johnson et al., 2002). Stres přispívá nejen k vývoji PPP jako takové, zejména jejich charakteristických příznaků (symptomy bulimie a úsilí o hubenost), ale také následného stupňování stresu, negativních stresorů v životě a příznaků deprese (Alda et al., 1989; Bodell, et al., 2012). Ukázalo se, že právě tyto negativní stresory, úzkost nebo deprese jsou vysoce dědičnými faktory. Řada studií

je proto nyní zaměřena na studium interakcí genového pozadí a prostředí (G x E) (Adams and Button 2008; Wade et al., 2009). Mimo výše uvedené, ke sdílenému vlivu prostředí na chování jedince, existuje řada zděděných znaků z pozměněné funkce genů, které jsou studovány u PPP (např. serotonerní, dopaminerní) (Trace et al., 2013). AN nebo BN jsou provázeny zkresleným pojetím vlastního těla, úzkostí, strachem z přibývání na váze spojenými s omezeními či někdy s nepříznivými životními událostmi. Spojením nutričního deficitu a metabolických důsledků stresu jako takového dochází k vyvolání druhotného stresu. Během reakce na tento stres mohou genetické faktory sehrát roli jak ochrannou, tak také zcela opačnou; záleží na přítomnosti funkčního polymorfismu nebo jinak ovlivněné genové expresi vyplývající z interakcí genového prostředí (Abraham et al., 2007; Nagata et al., 2000; Sachs-Ericsson et al., 2012).

### **1.3.7. Genetická vnímavost**

Otázka genetické vnímavosti k PPP není dořešena. Na manifestaci PPP se pravděpodobně podílí množství interagujících genetických složek, přičemž každá má mírný potenciál zvyšovat riziko PPP (Mazeo et al., 2009). Poruchy příjmu potravy vykazují navíc stále větší heterogenitu, což zvyšuje potřebu lépe definovat sledované fenotypy. Budoucí genetické studie onemocnění s multifaktoriální příčinou vzniku vyžadují přesnou a velmi důmyslnou fenotypizaci, která nemusí odpovídat současné klasifikaci (Mazzeo et al., 2009; Martásková a Papežová, 2005).

Většina studií byla prováděna v rámci Evropy. Chybí studie se zaměřením na etnické vlivy. A samozřejmě nelze opomenout, že k různorodosti projevu genetické informace výrazně přispívá prostředí prostřednictvím epigenetických vlivů či modulace transkripce a je nemožné zcela oddělit vlivy prostředí a vlivy genetické

(Bulik a Tozzi, 2004; Bulik, 2005; Kocourková et al., 1997). Epigenetické studie budou v nejbližší budoucnosti hrát stále významnější úlohu (Archer et al., 2013).

Cílem psychiatrického výzkumu v genetice by měla být možnost identifikovat rizikové genetické profily pro rozvoj různých psychiatrických postižení (De Mooij-van Malsel et al., 2008; Kas et al., 2008; LaPorte et al., 2008; Monteleone a Maj, 2008; Brooks et al., 2012). Tento přístup může, ale také nemusí, být otázkou vzdálené budoucnosti. Genotypizace také nabízí možnost diferenciální indikace antidepresiv s různým mechanismem účinku a šetrnějšího přístupu k podávání léků především stran možných vedlejších účinků nebo lékových interakcí (Benedetti et al., 2008; De Mooij-van Malsel et al., 2008; Gorwood, 2004; Monteleone a Maj, 2008).

## **2. CÍLE PRÁCE**

**2.1.** Cílem práce bylo založit databázi pacientek léčených v Centru pro poruchy příjmu potravy k iniciaci genetických studií, zaměřených na hledání nových endofenotypů, kterému se pracoviště dlouhodobě věnovalo (výzkum bolesti, hyperaktivity, sebepoškozování).

**2.2.** Potvrdit, poprvé v českém písemnictví, význam genetických korelátů u neurotransmiteru serotoninu u pacientek s AN a BN (serotonin se podílí na vnímání hladu, sytosti i zvýšeného prahu bolesti u AN).

**2.3.** Hledat zcela nové genetické vlivy (Hemoxygenáza-1 v interakci s vlivem prostředí stresových faktorů, zjišťovaných subjektivní dotazníkovou metodou ve srovnání s objektivizovaným monitorováním stresových faktorů) a postupně monitorovat význam dalších genetických faktorů u různých diagnostických subtypů a průběhů onemocnění (BDNF a kognitivní funkce).

### **3. HYPOTÉZY**

*Testovali jsme hypotézy, že:*

**3.1.** slovanská populace pacientek s AN má podobné genetické pozadí v serotogenní signalizaci jako populace nemocných v dosud publikovaných pracích (Francie, USA, Japonsko a další).

**3.2.** na ovlivnění projevů AN a BN onemocnění se podílí enzym hemoxygenasa-1 (HO-1), která má zásadní protektivní roli při metabolickém stresu a nebyla u tohoto onemocnění nikdy sledována.

**3.3.** HO-1 polymorfismy mohou vést u poruch příjmu potravy k různému vnímání environmentálního stresu a tím ovlivnit vznik i závažnost onemocnění.

**3.4.** existují další kandidátní geny, přispívající ke genetickému riziku onemocnění, které lze odhalit pomocí širokého homogenního souboru při celosvětové mezinárodní spolupráci (GWAS).



## **4. METODIKA**

## **4.1. Nemocní a kontrolní skupina**

### **Etické aspekty**

Studie byla povolena Etickou komisí 1. LF UK a VFN v Praze. Všichni jedinci, zahrnutí do studie, odevzdali vlastnoručně podepsaný souhlas informovaného. Odběr periferní krve a molekulárně genetické analýzy byly prováděny po získání informovaného souhlasu od všech osob zařazených do studie včetně kontrol.

#### **4.1.1. Charakteristika sledované skupiny nemocných**

Do této skupiny bylo zařazeno 75 nemocných s diagnózou AN (diagnóza na základě kritérií DMS-IV a ICD-10, Americká psychiatrická asociace) v 1. studii. Ve 2. studii bylo zařazeno 127 pacientek s AN i BN. Ve 3. studii GWAS jsme připěli do celkového vzorku 2907 pacientek s AN. Všichni nemocní byli zařazeni do skupiny během hospitalizace na Psychiatrické klinice 1. LF UK a VFN v Praze. BMI byl stanoven na počátku hospitalizace. Odběr periferní krve ke genotypizaci byl proveden v době hospitalizace a dotazník byl vyplněn v prvním týdnu hospitalizace. První studie byla provedena u 75 pacientů s AN (s průměrným věkem  $25,4 \pm 6,2$  let). Kontrolní skupina sestávala z 65 zdravých osob (s průměrným věkem  $25,8 \text{ let} \pm 5,1$  let). Druhá studie s rozšířením souboru byla provedena u 127 nemocných a u 78 kontrol s průměrným věkem  $25 \pm 7,1$  let u pacientů a  $26 \pm 5,1$  let u kontrol). Minimální věk pacientek byl 17 let a maximální věk 43 let.

#### **4.1.2. Charakteristika kontrolní skupiny**

Náhodně vybrané studentky, středoškolačky a vysokoškolačky různých oborů. Upoutávka pro účast ve studii byla provedena pomocí plakátů rozmístěných ve školách, účast v kontrolní skupině nebyla honorována.

## 4.2. Dotazníky

### 4.2.1. Dotazník EDE-Q; (Fairburn a Beglin, 1994; viz příloha 1)

obsahuje 41 položek k posuzování klíčových vlastností a psychopatologie PPP.

EDE-Q se skládá ze čtyř podškál:

1. Restrikce
2. Zaujetí hmotností
3. Zaujetí tělesnými tvary
4. Obavy z jídla.

Příloha 1 ukazuje z angličtiny přeložený dotazník používaný v našich studiích. Otázky 1 až 12 a 19 mají 7bodovou stupnici: 0 ("nikdy"), 1 ("1-5 dny"), 2 ("6-12 dnů"), 3 ("13-15 dnů "), 4 (" 16-22 den), 4 ("23 až 27 den"), a 6 ("každý den"). Otázka 20 je zodpovězena na 7bodové stupnici: 0 ("nikdy"), 1 ("párkrát"), 2 ("méně než polovina"), 3 ("polovina času"), 4 ("více než polovinu času "), 5 (" většinu času "), a 6 (" pokaždé "). Otázky 21 až 28 jsou zodpovídány na 7bodové škále od 0 ("vůbec ne") do 6 ("výrazně"). Dotazník obsahuje 6 dalších otázek (otázky 13-18), kde odpověď číslem udává, kolikrát se jedinec zabýval popsáním chováním během posledních 28 dnů.

Tyto otázky jsou (český překlad je uveden v závorce):

**13:** "Over the past 28 days, how many times have you eaten what other people would regard as an unusually large amount of food (given the circumstances)?"

("Kolikrát se Vám za posledních 28 dní stalo, že jste snědla takové množství jídla, které by jiní lidé za daných okolností považovali za neobvykle velké?")

**14:** "How many times did you have a sense of having lost control over your eating (at the time that you were eating)?"

("Při kolika z těchto příležitostí jste cítila, že jste nad jídlem ztratila kontrolu (ve chvíli, kdy jste jedla?)")

**15:** "Over the past 28 days, on how many days have such episodes of overeating occurred (i.e. you have eaten an unusual large amount of food and have had a sense of loss of control at the time)?"

(“V kolika dnech z posledních 28 dní jste se takto přejedla (t.j. snědla jste neovykle velké množství jídla a měla pocit, že jste nad jídlem ztratila kontrolu)?”)

**16:** “Over the past 28 days, how many times have you made yourself sick (vomit) as a means of controlling your shape or weight?”

(“Kolikrát za posledních 28 dní jste si přivodila zvracení za účelem kontroly tělesné hmotnosti a postavy?”)

**17:** “Over the past 28 days, how many times have you taken laxatives as a means of controlling your shape or weight?”

(“Kolikrát za posledních 28 dní jste si vzala projímadlo jako prostředek ke kontrole tělesné hmotnosti a postavy?”)

**18:** “Over the past 28 days, how many times have you exercised in a “driven” or ‘compulsive’ way as a means of controlling your weight, shape or amount of fat, or to burn off calories?”

(“Kolikrát jste za posledních 28 dní „nutkavě“ cvičila za účelem kontroly tělesné hmotnosti a postavy nebo abyste spálila kalorie?”)

Celkové skóre se vypočítá jako součet průměrů všech úrovní (škála 1 až 4).

#### **4.2.2. Social Readjustment Rating Scale (SRRS) - the Holmes and Rahe Stress Scale** (viz příloha 2)

Dotazník byl vyvinut psychology T. J. Holmesem a R. Rahem (1967). Sestavili seznam závažných životních situací (stresových), které mají vliv na duševní zdraví jedince a seřadili je podle závažnosti. Vycházeli ze zdravotní dokumentace více než 5,000 somatických pacientů, u kterých zjišťovali, jak se u nich mohly stresové události podílet na vzniku onemocnění. Pozitivní korelace mezi jejich životními událostmi a onemocněním byla 0.118.

Původní dotazník byl postupně upravován a validizován (stupnice závažnosti jednotlivých událostí se může měnit s časem i transkulturně). Zkoumána byla jeho reliabilita v různých populacích a užití v predikci onemocnění (Holmes and Rahe, 1967; Rahe et al., 1970; Rahe et al., 1972; Rahe and Artur, 1978; <http://encyclopedia.thefreedictionary.com/Social+Readjustment+111Rating+Scale>).

My jsme použili dotazník se 49 položkami. Dotazník byl přeložen z anglického jazyka dvěma nezávislými překladateli. Třetí nezávislý překladatel zajistil zpětný překlad českého textu zpět do anglického jazyka. Doktorandka se překladu ani jeho zpětné

verifikace neúčastnila. Srovnání textu výchozího a textu získaného zpětným překladem nevedlo k výrazným změnám.

Dotazník byl podle našeho zjištění použit v modifikované formě ve studii „Negativní životní události a karcinom kůže“ (Hnilica a spol., 2003). Detaily o získání české verze dotazníku v uvedené studii nejsou specifikovány, rovněž jsme je nezískali přímým dotazem u autorů studie. Citovaný nález je jediným dokladem v českém písemnictví, který se doktorandce podařilo dohledat.

Kalkulace celkového skóre spočívá v originálních pracech v součtu všech „jednotek životních událostí“. Skóre nad 300 znamená výrazné individuální riziko pro vznik onemocnění, skóre mezi 150 a 299 znamená mírné riziko onemocnění a pod 150 je riziko nízké. Pro účely této 2. studie bylo zpracování dotazníku modifikováno. V současné literatuře je výzkum stresových a především traumatického stresu velmi rozšířen. Zaměřuje se na výskyt posttraumatické stresové poruchy např. Trauma Screening Questionnaire (TSQ) i zvýšení rizik pro vznik mnoha dalších psychiatrických onemocnění (např. deprese). Pohled na traumatické události se v posledních letech rozšiřuje a vyvíjí, proto jsme použili dotazník zahrnující širší škálu stresových událostí a zkoumali, zda byly či nebyly v součinnosti s biologickými faktory subjektivně pacientkami vnímány jako traumatické a vztahující se k onemocnění.

#### **4.2.3. Sběr dat On-line**

##### **Sběr dat On-line**

Sebehodnotící dotazníky (EDE-Q) byly většinou administrovány on-line, pomocí systému Andromeda, vyvinutého specificky pro účely této studie. Jedná se o zabezpečenou databázi, která umožňuje anonymní vyplnění jednotlivých dotazníků a osobních údajů pacientkami a zároveň víceúrovňový přístup pro personál (lékař, sestry, správce databáze). Data je možné filtrovat a je eliminována chybovost způsobená nedovyplněním dotazníku. Počítačem prováděný sběr dat on-line má několik výhod ve srovnání s klasickou písemnou variantou. Umožňuje rychlý tok informací bez časové ztráty mezi sběrem a vyhodnocováním dat. Ukázalo se, že většina pacientů je schopna vyplnit dotazník prezentovaný prostřednictvím počítače, a dokonce tento typ sběru preferují před obvyklým testováním pomocí papíru a tužky. Administrace on-line dotazníků je vhodná především pro pacienty, kteří jsou relativně mladí a obvykle počítačově zdatní. Počítačem podporované prezentace dotazníků

snižují počet chybějících a chybně vyplněných položek, protože software neumožňuje účastníkům pokračovat v posuzování, pokud neodpověděli na všechny otázky. Také počítačem podporovaný sběr dat je ve srovnání s klasickými prostředky a ručním zpracováním dat více ekonomický, protože nevznikají žádné náklady na kopie nebo ruční zadávání dat. Terapeut vidí výsledky ihned po uložení dat a časové údaje razítka umožňují určení přesného času, kdy byl dotazník dokončen. Data se uloží do standardního databázového souboru a mohou být jednodušeji exportována do statistického programu pro další hodnocení.

Nicméně je třeba zmínit, že elektronický sběr dat má i své nevýhody. Za prvé technickým problémům se nelze vždy vyhnout. A přestože pracujeme se skupinou relativně mladých pacientů, ne všichni umí používat počítače a potřebují pomoc. Pro další sledování nemají všichni účastníci e-mail, na kterém by mohli pravidelně spolupracovat (Žuchová, disertační práce 2006).

### **4.3. Metody molekulárně-genetické**

#### **4.3.1. Obecná charakteristika použitých metod**

##### **Izolace genomové DNA**

Izolace genomové DNA z leukocytů periferní krve byla provedena standardní metodou vysolování. Koncentrace a kvalita izolované DNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

##### **Izolace mononukleárních buněk z periferní krve (PBMC)**

Izolace mononukleárních buněk z periferní krve byla provedena za použití HISTOPAQUE®-1077(Sigma-Aldrich), dle protokolu výrobce. Vzorky PBMC byly skladovány v -80 °C.

##### **Izolace RNA**

Totální RNA byla získávána z buněčných pelet fenol-chloroformovou extrakcí (ToRNAzol, GeneAge Technologies, a.s., Prague, CZ). Čistota RNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), integrita RNA byla stanovena na bioanalyzáru 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

### **4.4. Vlastní metodiky**

#### **Molekulárně genetické analýzy vybraných genů, které by mohly mít vliv na průběh AN a BN**

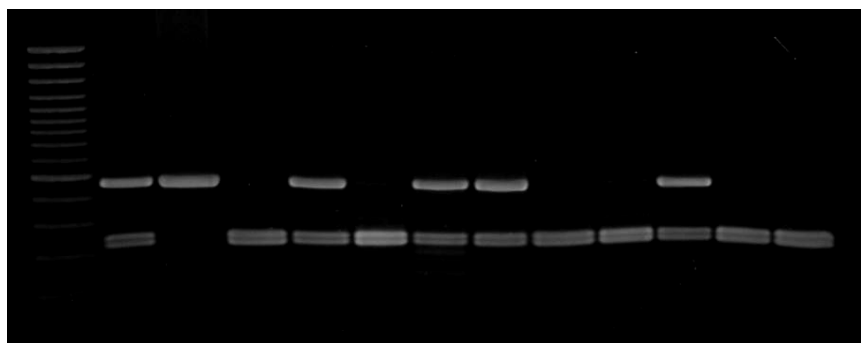
##### **4.4.1. Analýza polymorfizmu -1438 G/A v promotoru genu pro serotoninový receptor HT2A**

Polymorfizmus -1438 G/A, jež se nachází v regulační oblasti genu pro serotoninový receptor 5HT2A byl analyzován pomocí PCR reakce a následné restrikční analýzy. Primery pro PCR reakci a restrikční endonukleáza byly použity podle Ricca et al, 2004. Jedná se o dvojici primerů 1438G/A forward: 5'-

AAGCTGCAAGGTAGCAACAGC-3' a 1438G/A revers: 5'-AACCAACTTATTTCTACCAC-3'. DNA amplifikace produktu o velikosti 468 bp probíhala v cyklu Dyad (Biorad) následovně:

Počáteční denaturaci 95 °C / 2 následovalo 30 cyklů: 30 s při 95 °C, 60 °C, 30 s; 72 °C, 30 s; Závěrečná extenze probíhala 2 minuty při 72 °C. .

DNA replikace probíhala v reakční směsi obsahující polymerázu, pufr a ionty komerčně dodávané - Combi PP Master Mix (Top-Bio, Czech Republic). Celkový objem reakce činil 12,5 ul a obsahoval 2,5 pmol forward primeru, 2,5 pmol revers primeru and 15 ng DNA. PCR produkt byl následně štěpen přidáním směsi obsahující 0,2 ul restriční endonukleázy MspI, 1,3 ul pufru 10xTango a 3 ul vody. Tento mix byl inkubován 6 h při 37 °C. Štěpené produkty byly separovány elektroforeticky na 2,5% agarózovém gelu (BioRad). Vizualizace probíhala zpočátku v roztoku interkalačního činidla ethidium bromidu, který byl později nahrazen fluorescenční barvičkou GelRed (Biotium, Inc.). GelRed je plnohodnotná náhražka ethidium bromidu a na rozdíl od něj nemá toxické účinky.



**Obrázek:** Elektroforéza restriční analýzy polymorfizmu -1438G/A. V případě výskytu alely A zůstane fragment nenaštěpaný (468 bp), zatímco přítomnost G alely ukazují fragmenty o velikosti 244 a 224 bp. Marker 100 bp.

#### 4.4.2. Analýza polymorfizmů LPR a VNTR genu pro serotoninový transportér 5-HTT

Pro genotypizaci varianty LPR byla použita modifikovaná metodika (Betancour 2002) s primery LPR forward: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATG-3' a LPR revers: 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3'. PCR reakcí byly amplifikovány dlouhá (L, 528 bp) a krátká (S, 484bp) alela. Reakce probíhala v celkovém množství 12,5 µl s obsahem 25 ng genomové DNA, 0,4 mM každého primeru a 1x Plain PP Master



Mixu: 150 mM Tris-HCl, pH 8.8, 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.02 % Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM, dGTP, 400 µM dTTP a 100 U/ml Taq DNA polymerázy (Top-Bio, s.r.o). PCR reakce probíhala v cykleru Dyad (Biorad) za následujících podmínek:

Počáteční denaturace 94 °C na 2 minuty.

Následovalo 30 cyklů

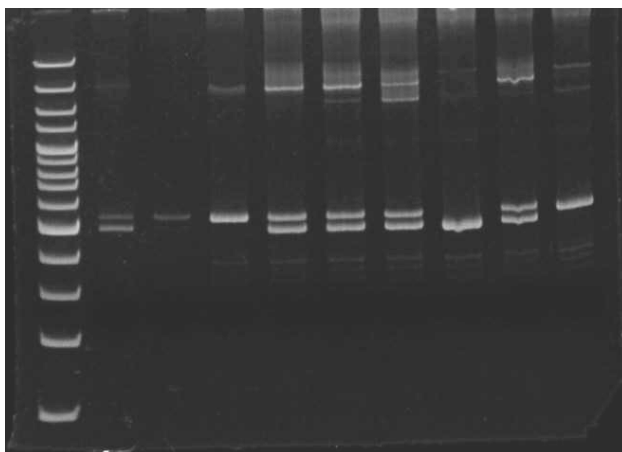
Denaturace 95 °C na 2 minuty

Annealing 65 °C na 30 s

Elongace at 72 °C na 45 s

Konečná extenze 72 °C na 5 minut

Amplifikovaný PCR produkt byl separován elektroforeticky na 3% agarózovém gelu na L a S alely a vizualizován pomocí fluorescenční barvy GelRed (Biotium, Inc.).



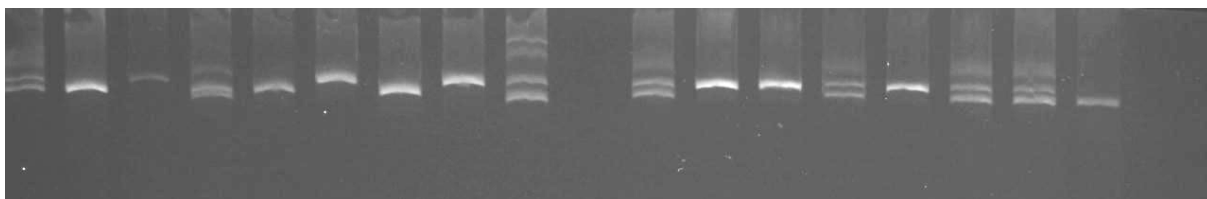
**Obrázek:** Elektroforéza LPR polymorfizmu zobrazující alely L – 528 a S – 484 bp. Marker 100 bp.

Polymorfizmus VNTR (variable nukleotid tandem repeats) byl analyzován za stejných podmínek s výjimkou teploty annealingu, která činila 63 °C a sekvence primerů (Betancour, 2002, modifikováno):

VNTR Forward: 5'-GCTGTGGACCTGGGCAATGT-3'

VNTR Revers: 5'-AGTGAAGACTGAAAAGACATAATC-3'

Polymorfizmus VNTR je také charakterizován opakováním sekvence nukleotidů a to v 9 (STin2.9), 10 (STin2.10) nebo 12 (STin2.12) repetících.

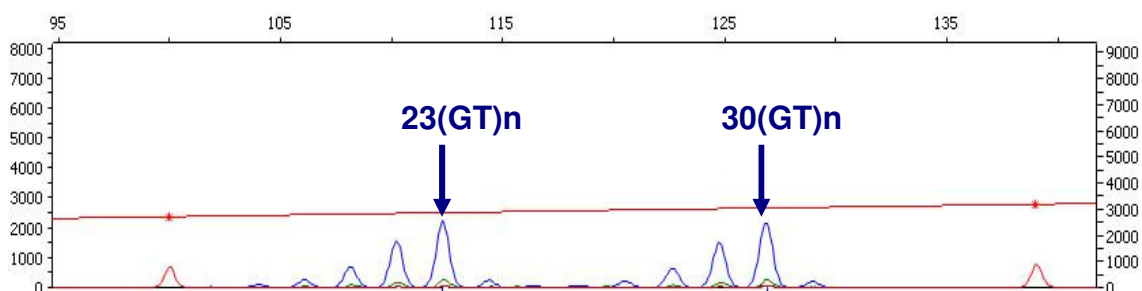


**Obrázek:** VNTR polymorfismus (alely 9, 10 a 12) na agarózovém gelu

#### 4.4.3. Analýza polymorfizmu v genu HO1

Genomová DNA byla běžným způsobem izolována z leukocytů periferní krve. Oblast promotoru genu HMOX1 obsahující (GT) $n$  repetice byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím fluorescenčně značeného sense primeru (HMOX1\_S 5-AGAGCCTGCAGCTTCTCAGA-3) a antisense primeru (HMOX1\_AS 5-ACAAAGTCTGGCCATAGGAC-3). PCR produkty byly vytvářeny ve směsi o objemu 25  $\mu$ l obsahující Plain Combi PP Master Mix (Top-Bio, Czech Republic), 1,6 pmol sense primeru, 1,6 pmol antisense primeru a 25 ng DNA. Amplifikace byla prováděna v termocykléru Dyad (BIO-RAD, USA)- a 5minutová denaturace při 95 °C byla následována 30 cykly složenými z 30 sekund při 95 °C, 30 sekund při 66 °C, a 30 sekund při 72 °C a nakonec finální extenzí při 72 °C po dobu 5 minut. Délky produktů PCR byly analyzovány na DNA sekvenátorech Li-cor 4200 (LI-COR Biosciences, USA) a ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Použili jsme značení primerů IR700 pro analýzy na přístroji Li-cor a značení primerů 6-FAM pro analýzy na sekvenátoru ABI. K stanovení délky fragmentů byl využit software SagaGT (LI-COR Biosciences, USA) a respektive Peak Scanner™ Software (Applied Biosystems, USA). Vybrané vzorky byly sekvenovány pomocí automatického DNA sekvenátoru ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) a dále byly zařazeny do každého běhu elektroforézy pro srovnání velikostí.

Rozdělili jsme alely podle počtu GT opakování na dvě skupiny na základě zvýšené indukce promotoru genu HMOX1 při oxidativním stresu zjištěné pouze u promotorů s méně než 25 (GT) $n$  - skupina S (short - krátké alely) a nižší indukce u promotorů s 25 nebo více (GT) $n$  - skupina L (long - dlouhé alely). (Skupina homozygotní pro alely S a skupina heterozygotní s jednou alelou S byly spojeny dohromady a porovnávány proti skupině homozygotní pro L.



**Obrázek:** Výstup fragmentační analýzy polymorfismu v promotoru genu HO-1 znázorňující nejčastější dvě alely s 23(GT)n a 30(GT)n (modrá křivka)

#### 4.4.4. Polymorfismus G196A (rs6265) v genu pro BDNF (brain-derived neurotrophic factor)

Genotypizace varianty rs6265 byla převzata podle Chou et al. (*Epilepsy Research* 60 (2004) 27–29) za použití primerů:

BDNF forward: 5'AGAGGCTTGACATCATTGGCT-3'

BDNF revers: 5'-GACTACTGAGCATCACCTGG-3'

PCR reakce probíhala v objemu 12,5 ul (složení reagensů identické s předchozí analýzou, pouze jiné primery).

Program:

Počáteční denaturace 94 °C na 2 minuty.

Následovalo 30 cyklů

Denaturace 95 °C na 2 minuty

Annealing 65 °C na 30 s

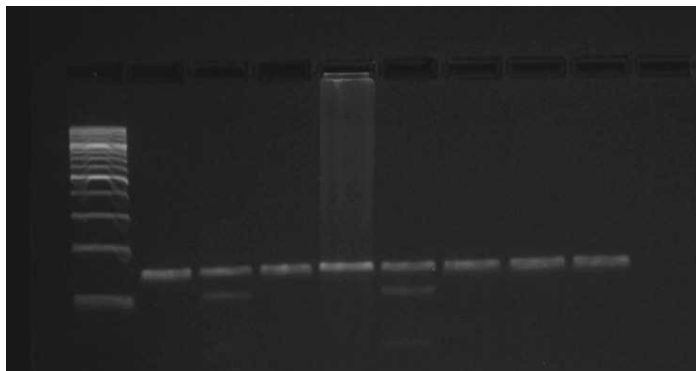
Elongace at 72 °C na 45 s

Konečná extenze 72 °C na 5 minut.

PCR produkt byl následně štěpen přidáním směsi obsahující 0,2 ul restriční endonukleázy Nla (Biolabs), 1,3 ul pufru NEB 4 a 5,48 ul vody. Tento mix byl inkubován 6 h při 37 °C

Štěpené produkty byly separovány elektroforeticky na 2,5% agarózovém gelu (BioRad).

Vizualizace probíhala pomocí fluorescenční barvičky GelRed (Biotium, Inc.).



**Obrázek:** BDNF polymorfismus po restrikční analýze, wild type alela G 136 bp, naštěpená alela A 98 a 38 bp.

## **5. VÝSLEDKY**

**Předmětem disertační práce jsou dvě publikace v časopise s impakt faktorem a kapitola v knize:**

**Martásková D**, Šlachtová L, Kemlink D, Záhoráková D, Papežová H: Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies. *Folia Biologica* 55, 192-197, 2009 (*IF* = 0,924)

Šlachtová L, **Kaminska D**, Chval M, Králík L, Martásek P, Papežová H: Stress perception and (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphism in HO-1 gene are both risk factors in eating disorder development. *Folia Biologica*, *in press*, (*IF* 2012 = 1,219)

**Martásková D**, Papežová H: Genetické aspekty poruch příjmu potravy *In*: Papežová (Ed.). Spektrum poruch příjmu potravy, Grada 2010, 56-61.

**Odkazují současně i na problematiku, jejíž řešení bylo umožněno založením DNA banky nemocných s poruchami příjmu potravin a zdravých dobrovolníků, na zahrnutí českého souboru nemocných do významné celosvětové genetické studie a dále na probíhající výzkum role BDNF v patogenezi PPP.**

Boraska V, Franklin CS, Floyd JAB, et al. A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, *in admission (revised resubmission, IF* 2012 = 14,897)

Papežová a kol. The role of genotypes of BDNF in anorexia and bulimia nervosa subtypes phenotypization. (*Publikace v přípravě, plánováno zaslání do časopisu Journal of Psychiatric Research, IF* = 4,066)

## **5.1. Publikace 1**

Martásková D, Šlachtová L, Kemlink D, Záhoráková D, Papežová H:

**Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies.**

Folia Biologica 55, 192-197, 2009 (*IF* = 0,924)

# Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies.

D. MARTÁSKOVÁ<sup>1</sup>, L. ŠLACHTOVÁ<sup>2</sup>, D. KEMLINK<sup>3</sup>, D. ZÁHORÁKOVÁ<sup>2</sup>, H. PAPEŽOVÁ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Psychiatry, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague

<sup>2</sup> Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague

<sup>3</sup> Department of Neurology, Charles University in Prague, 1st Faculty of Medicine and General Teaching Hospital, Prague, Czech Republic

*\*Corresponding author:*

Hana Papezova MD, PhD,  
Professor of Psychiatry,  
Department of Psychiatry,  
1st Faculty of Medicine,  
Ke Karlovu 11,  
121 08 Prague 2, Czech Republic  
Tel: (+420) 224 965 338  
Fax: (+420) 224 923 077  
e-mail: [hpap@lf1.cuni.cz](mailto:hpap@lf1.cuni.cz)

**Abbreviations:** AN, anorexia nervosa; 5-HT, serotonin, 5-hydroxytryptamine; OR, odd ratio; ICD, International Statistical Classification; DSM, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; ED, eating disorders; BMI, body mass index; VNTR, variable number of tandem repeats; LPR, linked polymorphic region

**Acknowledgements:** Supported by grant GAUK 27/2006

Authors thank Prof. Bettie Sue Masters, University of Texas Health Science Center for critical reading of manuscript. D.K. was supported from the Czech Ministry of Education (research program MŠM 0021620849)

**Key Words:** Anorexia nervosa; Gene polymorphisms; Serotonin; Meta-analysis; Czech population



## ABSTRACT

Anorexia nervosa (AN) is a serious psychiatric disease characterized by the inability to maintain normal body weight, predominantly occurs in woman and is characterized by restricted eating and obsessive fears of becoming overweight. The pathogenesis of AN is multifactorial with a clear genetic component. Serotonin transmission and its relationship to AN has been a topic of numerous studies. The frequently studied polymorphisms in the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene (-1438 A/G), and in serotonin transporter 5-HTT gene (LPR and VNTR) have led to controversial results in different populations. The aim of the study was to address association of the above-mentioned polymorphisms with AN in the Czech population. We genotyped a well-defined group of 75 patients with AN (average age of 25.39 years, SD 6.18; BMI on average 14.65, SD 1.38). The control group consisted of 65 healthy Caucasian females (average age 25.76 years, SD 5.12; average BMI was 20.69, SD 1.85). The 5-HT<sub>2A</sub> receptor -1438 polymorphism analysis showed a trend for the association with for risk allele A being in the same direction. In combination with the previously published Polish cohort, the allelic test reached a suggestive borderline ( $p = 0.0362$ ,  $\chi^2$  statistic, 1 df). In a meta-analysis, which includes all published results for allelic tests, the resulting P value is highly significant (0.0003,  $\chi^2$  statistic, 1 df). Using a quantitative association of 5-HT<sub>2A</sub> polymorphism with BMI in the Czech sample, a borderline association ( $p = 0.055$ ) was observed. In 5-HTT LPR polymorphism analysis, unlike in the 5-HT<sub>2A</sub>, neither allelic nor quantitative association with BMI for the biallelic 5-HTT marker was observed. The odds ratio in the Czech sample is in the opposite direction than in all other published studies, and their inclusion in the combined analysis, lowers statistical significance and OR, and broadens its 95% confidence interval. In the multiallelic 5-HTT VNTR polymorphism, we have not

observed any association either. Results of this study support previous reports of a significant role of A allele (-1438 A/G, 5-HT<sub>2A</sub> receptor) as a risk factor in AN. The study continues with the goal of genotyping different genes and doubling the patient number in the current Czech cohort.

## **Introduction:**

Anorexia nervosa (AN) represents a most serious psychiatric disease from the spectrum of eating disorders characterized by a pathological eating pattern with an inability to maintain a normal, healthy body weight. AN predominantly occurs in woman and is characterized by restricted eating and purging behavior, obsessive fears of becoming overweight, pathological body image perception and other multiple medical, hormonal, psychological and social complications (Faiburn and Harrison, 2003). Weight is maintained at least 15 % below that expected (either lost or never achieved), or Quetelet's body-mass index is 17.5 or less. Prepubertal patients fail to make the expected weight gain during the period of growth. The weight loss is self-induced by diets, avoidance of "fattening foods" and one or more of the following: self-induced vomiting, self-induced purging, excessive exercise, use of appetite suppressant and/or diuretics.

The body image distortion observed in AN patients is in the form of a specific psychopathology: with increasing emaciation, the patient's feeling of being too large persists and she imposes upon herself a low weight threshold. AN is an endocrine disorder of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, characterized by amenorrhea in women frequently "masked" by hormonal replacement therapy and in men by loss of sexual interest and potency. Elevated levels of growth hormone and cortisol, as well as decreased thyroid hormone and abnormalities in insulin secretion are also typical, as is onset-delayed or arrested development (growth, breasts and the genitals) in prepubertal patients (ICD-10, 2004, DSM-IV-TM 2000)

Meta-analysis of 42 outcome studies showed an annual mortality rate 0.56 %; 12 times higher than in the general population (Sullivan, 1995). The risk of death

from eating disorders was described to be 3 times higher than in depression, schizophrenia or alcoholism (Harris and Barraclough, 1998).

The pathogenesis of AN is multifactorial with a clear genetic component (Mazzeo et al., 2009; Sulek et al., 2007). The frequently studied polymorphisms in the serotonin receptor (-1438 A/G) and transporter (5-HTT LPR, 5-HTT VNTR) genes have led to controversial results (Serretti et al., 2007). However, other fields of genetic research in ED showed that appetite homeostasis (Hebebrand and Remschmidt, 1995; Krizova et al. 2008) and obsessive-compulsive personality disorder temperamental traits (Lilenfeld et al., 1998) contributing to development of the disease are under genetic control. Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) may play an important role in these mechanisms. Serotonin serves as important neurotransmitter in the central as well as in peripheral nervous systems. This neurotransmitter occupies a unique place in neurobiology, playing an important role in many physiologic processes (sleep, pain perception, appetite, hormone secretion, sexual behavior, and thermoregulation) (Murphy et al., 2008; Kaye, 2008).

There are lines of evidence associating changes in serotonergic activity with vulnerability to abnormal eating behavior and in the pathogenesis of AN. The frequently studied polymorphisms in the promoter of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor (-1438 A/G) gene, in the promoter and intron 2 of the serotonin transporter (5-HTT LPR, VNTR) gene have led to controversial results in different populations (Gorwood et al., 2003).

Therefore, the aim of the study was to genotype a well-defined group of patients with AN, and respective controls, to address the association of above mentioned polymorphisms with AN in the Czech population. Such a study has not been performed to date.

## **Methods and Patients:**

### **Probands**

The study was approved by the Institutional Ethics Committee and all patients and controls provided their written, informed consent. We genotyped 75 (for 5-HT2A) and 72 (for 5-HTT) patients with AN (diagnosed with DSM-IV and ICD-10) during their hospitalization. The BMI was calculated to be on average 14.65 (SD 1.38, range from 10.35 to 17.96), and an average age of 25.39 years (SD 6.18, range 18 to 47). The control group consists of 65 Caucasian healthy females, mostly students from regions of Bohemia and Moravia, Czech Republic, similar to the areas from which patients came, the average age 25.76 years (SD 5.12, range from 17 to 43), an average BMI was 20.69 (SD 1.85, range from 17.64 to 28.68).

### **Genomic DNA preparation**

Genomic DNA was extracted from peripheral blood anticoagulated with EDTA according to a standard protocol.

### **5-HT2A receptor -1438 polymorphism genotyping**

Polymorphism -1438 G/A in the promoter of the gene for the 5-HT2A receptor was analyzed after DNA amplification with PP Master mix polymerase from Top-Bio Ltd., (initial denaturation 95 °C/2 min followed by 30 cycles of 95 °C, 30 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 30s; with final extension at 72 °C for 2 min) using following oligonucleotides:

*1438G/A for: 5'-AAGCTGCAAGGTAGCAACAGC-3'*

1438G/A rev: 5'-AACCAACTTATTTCTACCAC-3'

The resulting DNA product was digested using *MspI*. If the -1438G allele is present, digestion leads to two fragments of 244 bases and 224 bases, respectively. If the -1438A allele is present the resulting product of amplification (468 bases) is not digested. The resulting products were separated using 1.5% agarose (Collier et al., 1997; Ricca et al., 2004).

### **5-HTT genotyping for 5-HTT LPR and 5-HTT VNTR polymorphisms**

The short and long alleles of 5-HTTLPR were amplified using primers

LPR Fw: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATG-3' and

LPR Rev: 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3'.

The 5-HTT VNTR region was amplified using primers:

VNTR Fw: 5'-GCTGTGGACCTGGGCAATGT-3' and

VNTR Rev: 5'-AGTGAAGACTGAAAAGACATAATC-3',

which yielded fragments containing 12 (STin2.12), 10 (STin2.10) or 9 (STin2.9) copies of the repeat element.

The PCR reactions were carried out in a total volume of 25  $\mu$ l, including 50 ng of genomic DNA, 0.4 mM of each primer, and 1x Plain PP Master Mix: 150 mM Tris-HCl, pH 8.8, 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.02 % Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dTTP, and 100 U/ml Taq DNA polymerase (Top-Bio Ltd., Prague, Czech Republic). Initial denaturation was at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles of 30 sec denaturation at 94 °C, 30 sec annealing at 65 °C (5-HTTLPR) or 63 °C (5-HTT VNTR), and 45 sec elongation at 72 °C, with a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR products were separated by 8% PAGE and stained with ethidium bromide (modified according to Betancur et al. 2002).

## Statistical analysis

Allelic and test full model association, quantitative association test (Wald test) for biallelic markers (5-HT2A, 5-HTTLPR) was calculated using routines incorporated in the PLINK statistical software package (Purcell et al., 2007). The association test for multiallelic marker 5-HTT VNTR was calculated with UNPHASED statistical suite (Dudbridge, 2003). The standard  $\chi^2$  statistic with 1 degree of freedom (df) were calculated in STATISTICA 99 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA, <http://www.statsoft.com>). Individual odds ratio were calculated using a web based calculator (Bland and Altman, 2000) and for statistical power estimation we also used a web based application – Genetic power calculator (Purcell et al., 2003).

## **Results and Discussion:**

Frequency, genotypes and alleles of three serotonin-related polymorphisms investigated in this study are depicted in Table 1 to Table 4.

**5-HT2A, -1438A/G:** The statistical power of the Czech cohort with entrance parameters, based on previous publications, is 8-9 %. In this cohort only, there is a trend for the association with OR for risk allele A being in the same direction. In combination with Polish cohort, allelic test reaches a suggestive borderline ( $p=0.0362$ ,  $\chi^2$  statistic, 1 df) (Rybakowski et al., 2006). Once all published results for allelic tests are taken together, the resulting P value is highly significant (0.0003,  $\chi^2$  statistic, 1 df). Results of the meta-analysis for -1438A/G polymorphisms of 5-HT2A are shown in Table 5.

By including previously published AN results, a statistically significant increase was observed, due to large enough sample size. However, the heterogeneity of

populations and the possible effect of stratification within these populations must be taken into account. Also using the quantitative association of 5-HT2A polymorphism with BMI in the Czech sample, a result with borderline association ( $p=0,055$ ) was observed (Table 6).

The role of the -1438G/A polymorphism in 5-HT2A in AN in different ethnic groups was repeatedly investigated in an attempt to replicate the classic study of Collier et al. (1997) in which they found in the British cohort of AN patients that 51 % of them have the -1438A allele while in the control group, only 42 %, had this allelic variant. A similar trend was found in the following study with another British cohort (Campbell et al., 1998; 48 % vs 42 %). A higher proportion of -1438 A allele among AN patients was also found in two independent Italian cohorts (Sorbi et al. 1998, 56 % vs 36 %; Nacmias et al., 1999, 55 % vs 39 %) and a cohort from United States (Enoch et al., 1998; 51 % vs 36 %). In the only study addressing the Slovanic population with AN in Poland, it was found that -1438A allele appears in 65% in patients and only 57% in controls. The results with opposite tendency were found in two independent German studies (Hinley et al., 1997a,b, 40 % vs 42 %; Ziegler et al., 1999, 36 % vs 34 %), a French study (Kipman et al., 2002, 42 % vs 48 %) and a Japanese study (Nishiguchi et al., 2001, 46 % vs 54 %). Our results show allele -1438A in 47 % patients with AN and in 42 % of controls (Table 1)

**5-HTT LPR and 5-HTT VNTR:** Unlike in the other marker, 5-HT2A, we have observed neither allelic, nor quantitative association with BMI for the bi-allelic 5-HTT LPR marker. The odds ratio in the Czech sample are in the opposite direction than in all other published studies, and their inclusion into the combined analysis lowers statistical significance and OR, and broadens its 95% confidence interval (Table 7).



In the multiallelic 5-HTT VNTR polymorphism, we have not observed any association as well.

In the study of Estonian adolescent girls it was shown that homozygosity in the 5HTTLPR long allele, indicator of higher serotonin system capacity, indicated a higher drive for thinness (Akkermann et al., 2008).

Recently, the new interest for genotyping of 5-HTR2A gene variants shows, in addition to their role in AN, the possible role of these polymorphisms in antidepressant pharmacogenetics (Ramos et al., 2007; Benedetti et al., 2008; Monteleone and Maj, 2008), as well as in the predisposition to obesity in different geographic areas (Sorlí et al., 2008; Ying et al., 2009).

**Table 1.** Frequency of genotypes and alleles of -1468 G>A polymorphism in 5-HT2A gene in patients and healthy controls

	Genotypes			Alleles	
	A/A	G/A	G/G	A	G
<b>Patients</b>	16 (21,3)	39 (52,0)	20 (26,7)	71 (47,3)	79 (52,7)
<b>Controls</b>	11 (16,9)	33 (50,8)	21 (32,3)	55 (42,3)	75 (57,7)

**Table 2.** Frequency of genotypes and alleles of LPR polymorphism in 5-HTT gene in patients and healthy controls

	Genotypes			Alleles	
	S/S	L/S	L/L	S	L
<b>Patients</b>	12 (16,7)	29 (40,3)	31 (43)	53 (36,8)	91 (63,2)
<b>Controls</b>	13 (20)	30 (46,1)	22 (33,9)	56 (43,1)	74 (56,9)

**Table 3.** Frequency of genotypes of VNTR polymorphism in 5-HTT gene in patients and healthy controls

	<b>Genotypes</b>					
	<b>9/9</b>	<b>9/10</b>	<b>9/12</b>	<b>10/10</b>	<b>10/12</b>	<b>12/12</b>
<b>Patients</b>	0	3 (4,6)	4 (6,1)	8 (12,1)	28 (42,4)	23 (34,9)
<b>Controls</b>	0	0	1 (1,4)	14 (19,7)	32 (45,1)	24 (33,8)

**Table 4.** Frequency of alleles of VNTR polymorphism in 5-HTT gene in patients and healthy controls

	<b>Alleles</b>		
	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
<b>Patients</b>	7 (4,8)	59 (41,0)	78 (54,2)
<b>Controls</b>	1 (0,8)	48 (36,9)	81 (62,3)

**Table 5.** Meta-analysis of the association studies analysing the -1438A allele of the 5-HT2A gene in anorexia nervosa patients and controls. ORs are shown with their 95% confidence intervals. (<sup>A</sup>Rybakowski et al., 2006; <sup>B</sup>Gorwood et al., 2003)

Origin	Group	A allele	G allele	P	OR	95% CI	
						from	to
Czech	Patients	71	79	0.3992	1.2255	0.7636	1.9668
	Controls	55	75				
Poles <sup>A</sup>	Patients	170	92	0.0847	1.4087	0.9535	2.811
	Controls	101	77				
Slaves (Czech+Poles)	Patients	241	171	0.0362	1.3732	1.0202	1.8484
	Controls	156	152				
Nine previously analyzed cohorts <sup>B</sup>	Patients	816	928	0.0043	1.20	1.07	1.35
	Controls	1443	1869				
Nine previously analyzed cohorts + Slaves	Patients	1057	1099	0.0003	1.2156	1.0923	1.3528
	Controls	1599	2021				

**Table 6.** Quantitative association with BMI (Wald test)

SNP	NMISS	BETA	SE	R2	T	P
5-HT2A	119	- 0.9076	0.4696	0.03094	- 1.933	0.05569
5-HTTLPR	119	- 0.4717	0.45	0.009304	- 1.048	0.2967

**Table 7.** Meta-analysis of the association studies analysing the S and L alleles of the 5-HTT gene in anorexia nervosa patients and controls. ORs are shown with their 95% confidence intervals. (<sup>A</sup>Rybakowski et al., 2006; <sup>C</sup>Gorwood et al., 2004)

Origin	Group	S allele	L allele	P	OR	95% CI	
						from	to
Czech	Patients	53	91	0.2896	0.7696	0.4738	1.2499
	Controls	56	74				
Poles <sup>A</sup>	Patients	78	114	0.4170	1.1873	0.7842	1.7975
	Controls	68	118				
Slaves (Czech+Poles)	Patients	131	205	0.9474	0.9895	0.7223	1.3555
	Controls	124	192				
Four previously analyzed cohorts <sup>C</sup>	Patients	341	373	0.0009	1.380	1.140	1.680
	Controls	374	566				
Combined all cohorts	Controls	472	578	0.0102	1.243	1.053	1.468
	Controls	498	758				

## **5.2. Publikace 2**

Šlachtová L, Kaminská D, Chval M, Králík L, Martásek P, Papežová H:

**Stress perception and (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter are both risk factors in eating disorders development.**

Folia Biologica, *in press*, (IF 2012 = 1,219)

# Stress perception and (GT)n repeat polymorphism in heme oxygenase 1 promoter are both risk factors in eating disorders development

SLACHTOVA L<sup>1</sup>, KAMINSKA D<sup>2</sup>, CHVAL M<sup>3</sup>, KRÁLIK L<sup>1</sup>, MARTASEK P<sup>1</sup>, PAPEZOVÁ H<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics and Adolescent Medicine, <sup>2</sup>Department of Psychiatry, <sup>1st</sup> Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic, <sup>3</sup>Institute for Research and Development of Education, Faculty of Education, Charles University in Prague, Czech Republic

**Keywords:** heme oxygenase-1, eating disorders, stress, anorexia, gene environment interactions,

## Corresponding author:

Prof. MUDr. Pavel Martasek, DrSc.

[pavel.martasek@gmail.com](mailto:pavel.martasek@gmail.com)

Department of Pediatrics and Adolescent Medicine  
1<sup>st</sup> Faculty of Medicine and General Faculty Hospital in Prague  
Ke Karlovu 2  
128 08 Praha 2,  
Czech Republic

**Acknowledgement** This study was supported by grants IGA NT 14094/3 from the Czech Ministry of Education and Health and Research program MSM 0021620849, PRVOUK P24/LF1/3 and P26/LF1/4, Charles University, Prague, Czech Republic

**Abstract:**

Heme oxygenase 1 (HO-1) plays a pivotal role in metabolic stress protecting cells according to reactive oxygen species. This study investigated a potential gene environment interaction between (GT)<sub>n</sub> repeat HO-1 polymorphism and the stress perception in patients with eating disorder and in controls. Stress perception and (GT)<sub>n</sub> polymorphism were measured in 127 patients with eating disorders and in 78 healthy controls using Stress and coping inventory and genotyping. Based on the inventory overall, specific and weighted stress scores were defined. Clinical stress score was generated according to the patient's history and interviews. According to our hypothesis, 1) all stress scores describing subjective stress perception were significantly higher in patients compared to controls ( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,002$ ;  $p \leq 0,001$ ), 2) the L/L genotype of GT promoter repeats ( $L \geq 25$  GT repeats,  $S < 25$  GT repeats) in patients was associated with higher overall ( $p \leq 0,001$ ), specific ( $p \leq 0,010$ ) and weighted stress score ( $p \leq 0,005$ ) compared to L/S variant and 3) Pearson's correlation of clinical versus objective stress scores showed not very tight relationship (0,198; 0,287; 0,224 respectively). We assume the potential risk of the L allele of HO-1 promoter polymorphism on the stress response and the contribution of subjective stress perception together with L/L genotype on the development of eating disorder. Decreased HO-1 expression in the presence of L/L genotype plus more intensive stress perception in patients can lead to the secondary stress with increasing severity of the symptoms and aggravation of the disease.



## **Introduction**

Restricting and insufficient food intake results in malnutrition with the lack of vital nutrients including vitamins and minerals (ascorbic acid, retinol,  $\alpha$ -tocopherol, selenium, zinc etc.). Altered balance between oxidants and antioxidants result in oxidative stress which has been described in anorexia nervosa, obesity or type 2 diabetes. (Faenza et al., 2012; Agnello et al., 2012; Chen et al., 2002). Disturbed feeding behavior has serious consequences on cell and complex metabolism affecting energy metabolism, thermogenesis or hormone secretion. Nutritive factors can also influence the gene expression. For example, an animal model of anorexia exhibits disturbed oxidative phosphorylation via down-regulating of assembly factor of complex I Ndufa1 (Lindfors et al., 2011). Another very important up- and down-regulated gene that responds sensitively to metabolic stress is heme oxygenase 1 (Abraham and Kappas, 2008).

Eating disorders (ED) including anorexia nervosa (AN), bulimia nervosa (BN) and unspecified eating disorder are multifactorial diseases with clear genetic component. As in other complex disorders the pathophysiology remains unknown. ED's are very heterogeneous diseases and endophenotype approach with the detailed focus on the clinical subgroups and their characteristic provides more opportunities for ED's therapy. We used this approach to investigate the influence of stress perception and (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphism in heme oxygenase 1 in ED patients.

## **HO-1**

Heme oxygenase 1 (HO-1 or HMOX-1), the key enzyme of heme degradation, catalyzes the oxidative cleavage of heme into biliverdin, Fe<sup>2+</sup> and CO. Subsequent

rapid conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase makes HO-1 the only rate limiting enzyme of bilirubin formation (Tenhunen et al., 1968). Besides the role of the enzyme in catalyzing heme degradation, the indirect effect of its reaction products (CO, biliverdin, bilirubin) are of great importance in maintaining cell homeostasis and regulating cell metabolism (Shibahara et al., 1987). Expressed in many tissues and up-regulated by multiple stimuli, HO-1 is involved in numerous antioxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory processes with the same aim: to protect the cell against oxidative stress (Abraham and Kappas, 2008; Tenhunen et al., 1969; Grochot-Przeczek et al., 2012; Exner et al., 2004; Exner et al., 2006; Poss and Tonegawa, 1997).

The highly conserved HO-1 gene is strongly expressed especially in the liver and the spleen. Constitutive expression of HO-1 provides a fast and an effective tool in regulating signal cascades via HO-1 reaction products; the signaling molecule, CO, is involved in anti-inflammatory pathways via modulation of MAPK, JNK, transcription factor AP-1 or nuclear factor NF- $\kappa$ B (Megias et al., 2007; Megias et al., 2009; Otterbein et al., 2000). Besides the stimulated expression of HO-1 in response to oxidative stress, transcription of the gene is modulated via genetic variants. So far, three functional polymorphisms in HO-1 gene have been identified: (GT) $n$  variable tandem repeat polymorphism and two single nucleotide polymorphisms G-1135A and T-413A, with the main interest focused on GT repeats (Hirai et al., 2003).

### **(GT) $n$ repeat polymorphism**

The variable tandem repeat polymorphism in the promoter of HO-1 gene is based on different numbers of consecutive GT nucleotides. It is located approximately 250 bp

upstream from the transcription start site. The size of the GT repeats varies from 12 to 40 repeats. *In vitro* studies demonstrate reduced transcription activity of the HO-1 gene in cell lines with a larger size of (GT)*n* repeats (L allele) compared to shorter variants (S allele). This leads to an impaired induction of HO-1 exposed to reactive oxygen species and a decreased response to oxidative stress (Chen et al., 2002; Yamada et al., 2000; Taha, et al., 2010). Several classifications according to allelic size, are used with the most frequent alleles of 23 and 30 GT repeats (Baan et al., 2004; Schillinger et al., 2004; Yamada et al., 2000).

### **Stress perception and its inheritance**

Recent research has supported the role of lifetime severe stress and trauma in the development, maintenance and relapses of eating disorders (Johnson et al., 2002). The stress contributes not only to the development of ED, mainly their specific symptoms (bulimic symptoms and drive for thinness), but also to subsequent stress generation, negative life stressors and depressive symptoms (Alda et al., 1989; Bodell et al., 2012). Negative stressors, anxiety or depression have been shown to have high heritability. Therefore, a gene-environment (G x E) approach is now being taken in many studies (Adams and Button 2008; Wade et al., 2009). In addition to the shared environmental influence of behavioral patterns there are many inherited traits resulting from the altered function of the genes of interests (e.g., serotonergic, dopaminergic, opioidergic) (Trace et al., 2013). AN or BN are accompanied by distorted body self-perception, anxiety, fear gaining weight combined with restricting or sometimes the lifetime adverse events. Taken together with the lack of nutrients and metabolic consequences of the stress itself, secondary stress is generated. Genetic factors may play both, protective or non-protective roles in stress response

depending on the presence of functional polymorphisms or otherwise influenced gene expression or epigenetic modifications resulting from gene-environment interactions (Abraham et al., 2007; Nagata et al., 2000; Sachs-Ericsson et al., 2012).

## **Methods**

### **Ethics and Samples**

A total of 127 patients and 78 control samples were analyzed. All patients and controls were Caucasian females from the Czech Republic. The study was approved by the Ethic Committee of General Faculty Hospital and 1<sup>st</sup> Faculty of Charles University in Prague. All probands agreed with their participation in the study and signed the informed consent. The control group was recruited from healthy female students and young healthy woman working in hospital matched by age, sex and socio-economical status. All patients and controls answered the inventories and gave their DNA samples anonymously.

### **Measures**

The Stress and Coping Inventory (SCI) was designed for health promotion, as an educational instrument and a research tool and its reliability and validation were carried out by Holmes and Rahe (Holmes and Rahe, 1967; Rahe et al., 2000). SCI questionnaires for Youth and Adults with 49 questions were answered by patients during the first two weeks of their hospitalization. The same questionnaires were answered by healthy controls. SCI data were evaluated via the models of Stress scores. Objective Stress Score (OSS) was calculated as a cumulative sum of positive answers (adverse event present = 1, absent = 0) to all SCI items (with the maximal value of 49 points). Specific Stress Score (SSS) was counted as a sum of selected

items known as the risk factors for eating disorders (ED specific items; event present = 1, absent = 0). These items (1, 2, 4, 5, 8, 12, 13, 15, 18, 21, 25, 26, 27, 29, 34, 39, 44, 45, 49) are known to play important roles in the onset or relapse of eating disorders (Pavlova, 2010). Finally, Weighted Stress Score (WSS) was evaluated according to Rahe, given each item different value (e.g. personal injury or illness 53 points, change in social activities 18 points etc.) (Holmes and Rahe, 1967; Rahe et al., 2000).

Next, the Clinical Stress Score (CSS) was established as the objective stress measure which resulted from complex clinical evaluation by an independent psychiatrist, trained in ED, trauma research and treatment. CSS was based on the observations on the ward, clinical interviews during the hospitalization and evaluation of the actual and past case history; all information available was considered (from patient's outpatient and inpatient documentation). The life adverse events were rated absent = 0, present = 1, severe and/or repeated = trauma 2)

### ***Clinical assessment***

The study cohort consisted of female patients with primary DSM-IV diagnoses of anorexia or bulimia nervosa, successively hospitalized at the Specialized Unit for Eating Disorders (ED), in General Faculty Hospital, Prague, in years (2006 - 2013). Patients with ED and comorbid primary diagnosis of alcohol abuse or personality disorders were excluded from the study.

Eating pathology was assessed with the 36-item Eating Disorder Examination (EDE-Q), semi structured interview that monitors the severity of specific eating-related

pathology over 28 day before assessment. It contains a Global Scale, which is the average of the 4 subscales: Shape Concern, Weight Concern, Eating Concern and Restraint. This measure has been demonstrated to have acceptable reliability and validity (Kelly et al., 2012; Berg et al., 2012; Rizvi et al., 2000). The diagnoses were confirmed by 2 experienced psychiatrists specialized in Eating Disorders.

Average age was  $25 \pm 7.1$  years in patients with ED and  $26 \pm 5.1$  years in controls. Average body mass index (BMI in  $\text{kg/m}^2$ ) was  $15.4 \pm 2.7$  in AN patients;  $21.7 \pm 3.1$  in BN patients and  $19.9 \pm 3.9$  in controls. Clinical data from the patients with ED were collected during their six to eight week hospitalization at the Unit for Eating Disorders, with a comprehensive specialized ED program (re-alimentation, régime, psychotherapy and rehabilitation).

### **Genotyping and Statistical analyses**

Genetic analyses were performed after the DNA extraction using a standard desalting method. Heme oxygenase 1 promoter polymorphisms of GT repeats were genotyped according to Kral et al. (Kral et al., 2011). For the genotype distribution in the HO-1 gene, we classified according to long ( $L \geq 25$  GT repeats) and short alleles ( $S < 25$  GT repeats). Statistical analyses were performed with SPSS software version 17.0, (SPSS Inc., Chicago). For the estimation of differences of subjective stress perception among the groups - patients compared to controls *t-test* was used. The same *t-test* was used for the comparison of stress scores in L/L and L/S genotypes. Correlation of the objective and subjective stress indexes was evaluated with Pearson's correlation.

## Results

### Stress Indexes

Subjective perception of stressful events in patients and in controls was described using cumulative stress scores OSS (overall), SSS (specific) and WSS (weighted). Subjective evaluation of presence of stressful life events in patients according to Stress Coping Inventory was significantly higher compared to controls ( $p \leq 0.001$  for OSS;  $p \leq 0.002$  for SSS and  $p \leq 0.001$  for WSS), see Table 1. The average of weighted stress scores for subjective stress perception was 471 points in patients compared to 359 points in controls (see Graph 1 for detail).

### G x E interaction of (GT)<sub>n</sub> repeats and stress perception

Association of HO-1 promoter polymorphism and subjective stress perception was tested in 127 patients and 78 controls (t - test). The distribution of HO-1 genotypes in patients and in controls did not deviate from Hardy-Weinberg equilibrium (Wellek et al., 2010). Also, frequency of the minor allele S in both groups of patient and controls was higher than 0.05 cut-off for rare alleles. The genotype frequencies found in our cohort are consistent with the population data from other Caucasians (Denschlag et al., 2004; Gregorek et al., 2013; Rueda et al., 2007; Weis et al. 2012). For the analysis of subjective stress perception and its score in particular genotypes, S/S genotype carriers were excluded involving 11 patients and 8 controls. Even when the rare incidence of S/S genotype was in accordance with the epidemiological data, the group's size is not sufficient to be included into further statistical analyses.

Significant differences among patients with the genotype L/L compared to L/S were found in the overall stress score ( $p \leq 0.001$ ), specific stress score ( $p \leq 0.01$ ) and

weighted stress score ( $p \leq 0.005$ ), with higher value of stress scores in patients with L/L genotype compared to L/S genotype, see Table 2. Detailed values of WSS are shown in Graph 1. Moreover, the analysis of the grouped cohort of patients and controls ( $n = 186$ ) showed the same tendency. The combined cohort showed significant increase of all subjective stress scores in carriers of L/L genotype compared to L/S (OSS  $p \leq 0.002$ ; SSS  $p \leq 0.005$  and WSS  $p \leq 0.002$ ; see Table 3). In summary, L/L genotype of HO-1 gene was found significantly associated with higher values of objective stress perception both in control's and in patient's group (Graph 1).

#### Subjective versus objective stress perception

Subjective stress perception expressed by OSS, SSS and WSS was compared with the clinical stress score. This analysis was performed only in patients ( $n = 127$ ). Pearson's correlation of subjective (OSS, SSS, WSS) and objective stress (CSS) did not revealed a tight relationship between subjective and objective stress scores (.198\* for OSS; .287\* for SSS and .224\* for WSS; \*p value for all cases  $\leq 0.025$ ), see Table 4. This represents the validity of all three indexes on one side and their different focus on the other side.

### **Discussion**

Development of eating disorders can be interpreted as a maladaptive reaction defense against a perceived threat or trauma (relational, physical, sexual stress or trauma). In eating disorders, physical and psychological stress is closely related (in malnutrition, cognition or concentration). Stress perception or sensitivity to stress, the



very important factors in ED pathology, are influenced exactly by the coincidence of physical and psychological factors, often interacting in the gene environment interactions.

In our study we focused on stress perception described via Stress and Coping Inventory (Rahe et al., 2000). Several stress scores have been developed including overall, specific, weighted (subjective stress perception) and clinical stress score (objective stress perception). All scores describing subjective stress perception regardless of their different methodology showed significantly increased subjective stress perception in patients compared to controls (see Table 1). This was consistent with our hypothesis which supposed ED patients more sensitive to stress than healthy controls. Higher sensitivity to stress is accompanied with malnutrition, exhaustion, neuro-endocrinological changes or psychological factors such as high demands on one's own body, restraining, perfectionism and other stress-related behavioral factors (Hague et al., 2013; Patterson et al., 2013). Malnutrition can have, and in ED patients often has, the fatal consequences. We can also speculate for the long term stress to have impact on brain function. Recently, the reduction in 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding potential has been shown in a long term occupational stress (Blix et al., 2013). Stressful life events resilience is also associated with Val66Met polymorphism in brain derived neurotrophic factor (BDNF) or Val158Met in catechol-O-methyltransferase gene. Val66Met in BDNF has also been studied in ED but with inconsistent results (Kim et al, 2013; Poletti et al, 2013; Trace et al, 2013).

Because of the importance of G x E interactions in ED pathogenesis, we investigated HO-1 promoter repeats polymorphism and its association with subjective stress perception in patients with ED and in controls. Heme oxygenase 1 is the crucial

enzyme whose expression is strongly regulated in response to stress stimuli. Decreased expression HO-1 gene with L allele compared to S allele has been demonstrated *in vitro* studies (Taha et al., 2010; Chen et al., 2002; Yamada et al., 2000). To our knowledge, no data following HO-1 gene polymorphism and stress response or eating disorders are available. In this study we hypothesize that the combined effect of HO-1 (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphism and subjective stress perception may play a significant role in the development of eating disorders or in their stress response. We assume that carrying L/L genotype with the lowest level of HO-1 expression results in less efficient protection against metabolic stress. Several studies describe the HO-1 impact on certain metabolic disorders including obesity, type 2 diabetes, hepatic injury or hormonal regulation (Bakken et al., 1972; Abraham et al., 2007; Eipel et al., 2007; Abraham et al., 2008).

Our data suggest the significantly increased tendency of stress perception in subjects with the „non-protective“ L/L genotype and its contribution to ED pathology (Table 2, Graph 1). For genotype environment interactions of HO-1 and subjective stress perception the evaluated weighted stress score according to Rahe was used as a representative (Graph 1) (Rahe et al., 2000; Holmes and Rahe, 1967). Very similar results of overall and specific stress scores according to HO-1 genotype were received (Table 2).

The same association of subjective stress perception and HO-1 (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphism was documented in mixed cohort of patients and controls with interesting results. Even in mixed cohort, the significant association of L/L genotype with a higher subjective stress perception was observed. This confirms the solid

association of L/L genotype with subjective stress perception in all three scores (Table 3). The importance of stress perception and HO-1 repeat polymorphism on ED pathology is summarized in Graph 1. Firstly, L/L genotype is associated with a higher stress perception in patients and also in mixed cohort. Secondly, controls always show a lower stress score than ED patients. Taken altogether, the lowest stress score has been observed in suspected more protective L/S genotype in controls (300 points), followed 388 points in controls with L/L genotype, next in patients with L/S (398) and finally in L/L patients 527 points.

Another aim of the study was to compare subjective and objective stress perception, which included very detailed clinical observations and careful history. Lifetime exposure to stressful events (here represented by objective stress perception or clinical stress score), and subjective stress perception, even when each describes the different perspective, are both important factors in ED pathology. Stress perception and response in ED are tightly related to hormonal balance as it has been demonstrated in animal models (Hague et al., 2013; Heiman et al., 1997; Patterson et al., 2013). In addition several studies report stressful life events heritability (Plomin et al., 1990; Kendler et al., 2007; Power et al., 2013). The correlation of objective and subjective stress scores confirmed the hypothesis, that the patients with ED have altered perception of one's own body or stress (Madsen et al., 2013; Keizer et al., 2013; Stice et al., 2002; Cash et al., 1997). For the subjective perception stress scores, the highest level of consistency with the clinical score showed ED specific stress score (SSS = 0,287; WSS = 0,224; OSS =0,198. The specific stress score has been established by ED specialized psychiatrics based on the clinical relevance of the items from Rahe's SCI.

In conclusion, the current study showed that the objective stress perception together with (GT)<sub>n</sub> promoter repeat polymorphism in HO-1 gene influence ED pathology or stress related disorders. Considering the limited size of our cohort, further studies are needed to confirm the G x E interactions of stress perception and HO-1 gene.

**Table 1 – Subjective stress perception differences between ED patients and controls**

		<b>n</b>	<b>Mean</b>	<b>t</b>	<b>p-value</b>
Overall Stress Score	controls	78	10.03	-3.726	0.001
	patients	127	13.72		
Special Stress Score	controls	78	3.45	-3.07	0.002
	patients	127	4.71		
Weighted Stress Score	controls	78	359	-3.318	0.001
	patients	127	471		

\* critical value for degrees of freedom for all scores, df = 203

**Table 2 - Subjective stress perception in L/L and L/S genotypes in patients**

		<b>n</b>	<b>Mean</b>	<b>t</b>	<b>p-value</b>
Overall Stress Score	L/S	57	11.18	-3.372	0.001
	L/L	59	15.66		
Special Stress Score	L/S	57	3.86	-2.622	0.010
	L/L	59	5.37		
Weighted Stress Score	L/S	57	398	-2.852	0.005
	L/L	59	527		

\* critical value for degrees of freedom for all scores, df = 114

**Table 3 - Subjective stress perception in L/L and L/S genotypes in mixed cohort**

		<b>n</b>	<b>Mean</b>	<b>t</b>	<b>p-value</b>
Overall Stress Score	L/S	87	10.37	-3.372	0.002
	L/L	99	13.62		
Special Stress Score	L/S	87	3.53	-2.622	0.005
	L/L	99	4.73		
Weighted Stress Score	L/S	87	364	-2.852	0.002
	L/L	99	470		

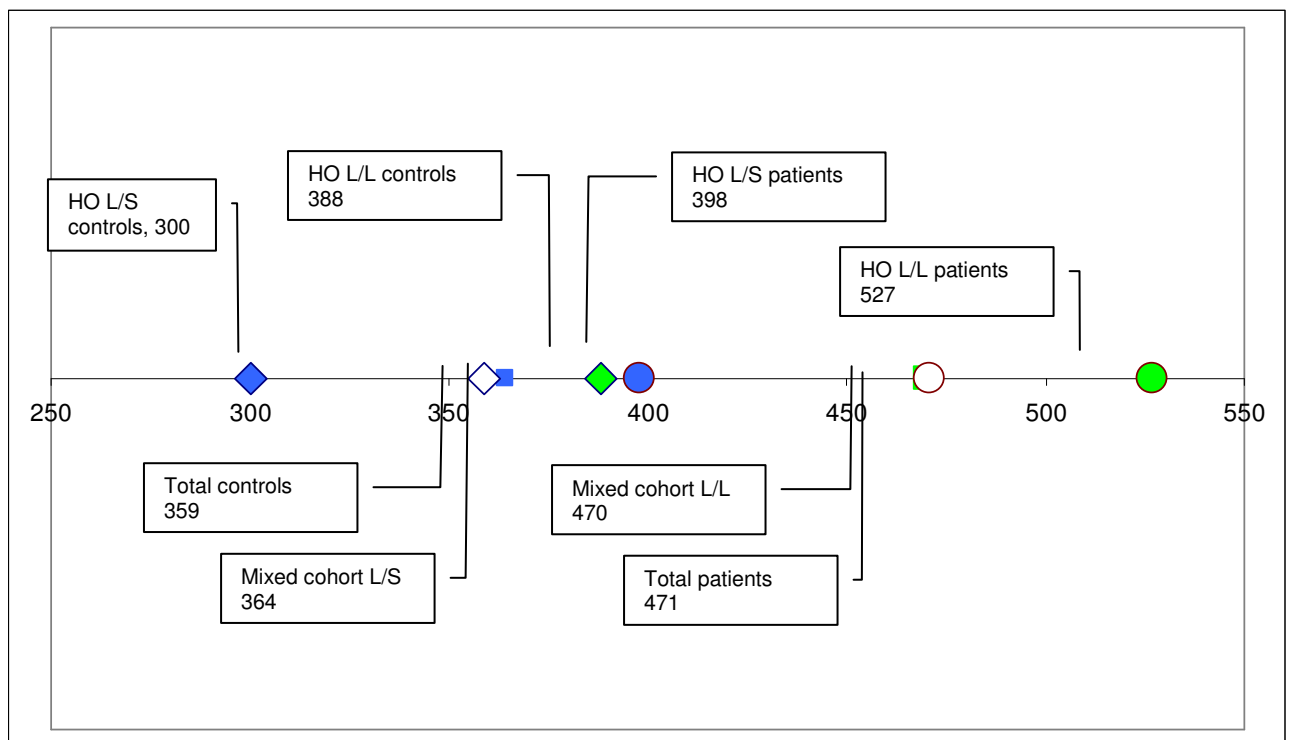
\* critical value for degrees of freedom for all scores, df = 184

**Table 4 - Objective versus subjective stress perception**

	<b>OSS</b>	<b>SSS</b>	<b>WSS</b>
CSS Pearson's Corr.	0.198	0.287	0.224
p-value	0.025	0.001	0.010

Stress scores: CSS – Clinical, OSS – Overall, SSS – ED Specialized, WSS – Weighted

**Graph 1 - Values of objective weighted stress score (WSS) according to HO-1 genotypes in patients and in controls are shown on horizontal axis**



**Graph 1 - Legend of the point's distribution on axis: rhombus - controls, square - mixed cohort of patients and controls, circle - patients; blue – L/S genotype, green – L/L genotype, white – all genotypes mixed**

The lowest stress score has been observed in the “more protective ”L/S genotype in controls, followed by controls with the L/L genotype. A higher stress score was found in patients with the L/S genotype and the highest value in L/L patients. Weighted stress score was measured according to Rahe (Rahe et al., 2000; Holmes and Rahe, 1967);

## **5.3. Publikace 3**

**Martásková D, Papežová H:**

**Genetické aspekty poruch příjmu potravy.**

***In:* Papežová (ed.). Spektrum poruch příjmu potravy.**

**Interdisciplinární přístup**

**Grada, Praha 2010, 56-61.**



Genetický výzkum obvykle začíná hledáním zvýšeného výskytu určitého znaku onemocnění v rodinách. Nejinak tomu bylo i v hledání genetických determinant (predispozic) u poruch příjmu potravy (dále PPP). Již v sedmdesátých letech Theander (1970) publikoval studii, kde 6,6 % sourozenců z 94 sledovaných pacientek s AN trpělo tímž onemocněním. O 10 let později Crisp et al. (1980) zjistil pravděpodobný výskyt AN u matky v anamnéze u 14 % pacientek s diagnózou PPP. V 90. letech Strober et al. (1990) upozornil, že v jeho souboru trpělo AN 6,2 % matek sledovaných pacientek s AN a 2 % jejich sester. Dle Hsu (1990) se v rodinách pacientek s AN a BN vyskytují poruchy příjmu potravy pětikrát častěji, než v běžné populaci.

Studie rodin mohou ovšem nejvýše ukázat, že daný znak se vyskytuje častěji u příbuzných než v kontrolní populaci. To ale není důkazem genetického původu. Podobnost příbuzných může mít i negenetické příčiny např. infekce, dieta, kulturní zvyky apod.

### **Studie dvojčat**

Naproti tomu ze studií dvojčat nebo z adopčních studií je již možné činit závěry o genetických vlivech. Ve studiích dvojčat se obvykle srovnává shoda (konkordance) sledovaného znaku u jedno a dvouvaječných párů. Při předpokladu shodných vlivů prostředí u obou typů párů jsou rozdíly v konkordanci vysvětlovány genetickými faktory. Jednovaječná dvojčata sdílejí všechny geny, dvouvaječná polovinu. Zatímco jednovaječná dvojčata mají tedy stejnou genetickou výbavu, dvouvaječná dvojčata jsou geneticky stejně odlišná jako ostatní sourozenci. Srovnání výskytu určité poruchy u jedno a dvouvaječných dvojčat pak ukazuje na podíl genetických faktorů.

Holland et al. (1984) a kolegové informovali, že ze 30 párů dvojčat ženského pohlaví v Londýně trpělo AN 9 ze 16 (56 %) monozygotních párů, 1 ze 14 (7 %) dizygotních párů. Tři z neanorektických sourozenců měli jinou psychickou poruchu. Výskyt PPP se většinou pohyboval mezi 25-50 % u jednovaječných a kolem 10 % u dvouvaječných dvojčat. Hsu (1990), který sledoval šest jednovaječných a dva dvouvaječné páry, zjistil PPP u dvou jednovaječných dvojčat. Fichter a Noegel (1980) však prokázali BN jen u jedné dívky z 27 párů dvojčat, kde jedno z dvojčat trpělo PPP. Podle nich jednovaječná dvojčata projevují zvýšenou genetickou vulnerabilitu pro PPP, ale současně i pro jiné duševní poruchy, například pro depresi. Water a Beumont (1990) nezjistili PPP u žádného ze sourozenců z jedenácti dvouvaječných a jednovaječných dvojčat trpících AN.

Studie rodin a především dvojčat potvrzují, že PPP jsou familiárním onemocněním s genetickým podílem (Bulik et al., 2000; Martásková a Papežová, 2005). Heritabilita u PPP (Bulik a Tozzi, 2004) se pohybuje v rozmezí 33-84 % u anorexia nervosa a 28-83 % u bulimia nervosa.

## **Studie rodin**

Systematické studium genetických komponent u PPP se soustředilo nejen na studie dvojčat v souvislosti s tímto onemocněním, ale i na výskyt jiných psychiatrických poruch v rodinách nemocných. Množství genetických faktorů je sdíleno nejen různými variantami PPP, ale taktéž dalšími psychickými poruchami (LaPorte et al., 2008; Papežová, 1997). Ještě častěji než PPP se v rodinách pacientů s AN a BN vyskytují různé afektivní poruchy. Proto Hudson a kol. (1983) dokonce vyslovili hypotézu, že BN je variantou afektivní poruchy. Podle Hsu (1990) je deprese v rodinách pacientek s AN třikrát častější než v běžné populaci. Alkoholismus rodičů

v souvislosti s rozvojem poruchy uvedlo 24 % pacientek, 4 % z kontrolní skupiny (Krch, 1999). DiNicola (1990) diagnostikoval depresivní symptomatiku u pacientů s PPP v rozmezí 25-75 %. Osobnost pacientek s AN bývá charakterizována (Kocourková et al., 1997) jako svědomitá, snaživá, pečlivá, perfekcionistická. Bývá kladena otázka, zda není jídelní patologie manifestací primární obsedantně – kompulzivní poruchy, stejně tak, jako není-li možné obsedantní symptomatiku pokládat za následek procesů hladovění. Obsedantní rysy našla ve svých souborech většina autorů. Je uváděno až 37 % pacientů s PPP, kteří splnili kritéria pro obsedantně – kompulzivní poruchu (Kocourková et al., 1997).

Jsou hledány fenotypy, které povedou k identifikaci jednotlivých oblastí genů, jež se u AN a BN uplatňují. Dosud byly studovány neuropeptidy, indolaminy, katecholaminy, melanokortin, neuropeptid Y, transportér norepinefrinu, leptin, opiody a řada dalších. Tyto studie ovšem dosud nebyly opakovány s konzistentními výsledky.

Některé asociační studie poukazují na existenci „susceptibility loci“ na chromozomu 10 pro BN a chromozomu 1 pro AN (Bergen et al., 2003; Bulik a Tozzi, 2004). Celogenomové asociační studie povedou k odhalení nových kandidátních genů, bude však záležet na heterogenitě studované skupiny, budou-li výsledky replikovány (Kas et al., 2008).

### **Role serotoninu**

Při studiu PPP se stále více zaměřuje pozornost na roli serotoninu. Serotonin prostředkuje pocit sytosti a částečně reguluje příjem sacharidů (Kocourková et al., 1997). BN je spojována s deficitem serotoninergní aktivity v CNS, následného oslabení pocitu sytosti a záchvaty přejídání. Tímto zjednodušeným mechanismem lze částečně vysvětlit pozitivní výsledky léčby SSRI (serotonin reuptake inhibitors) u

tohoto onemocnění. AN je naopak spojena se zvýšenou senzitivou nebo zvýšenou koncentrací serotoninu, následným omezením příjmu jídla a poklesu tělesné hmotnosti.

Serotonin je syntetizován z tryptofanu. Dlouhodobé hladovění může vést ke snížení množství potravou přijatého tryptofanu. Tryptofanová deplece redukuje serotoninovou syntézu a dostupnost serotoninu v mozku. Aktivita serotoninu je ukončena jeho zpětným vychytáváním (reuptake) serotoninovým transportním proteinem. Serotoninový transportér vykazuje polymorfismus S/L (short/long) alely v promotorové oblasti genu serotoninového transportéru, přičemž právě tento polymorfismus může být spojen s účinností antidepresiv. Rozdílnost v odpovědi jednotlivých pacientů na medikaci a závažnost nežádoucích účinků může být tedy ovlivněna genetickou dispozicí. Caspi et al. (2003) spojuje přítomnost S alely s častější diagnosou deprese a vyšší incidencí suicidia. Murphy (2004) pozoroval u depresivních pacientů s S alelou nižší účinnost fluvoxaminu a paroxetinu, u paroxetinu taktéž vyšší výskyt nežádoucích účinků. Naopak Kim et al. (2000) zaznamenal lepší odpověď na antidepresivní léčbu u korejských pacientů. Minov et al. (2001) nezjistil žádný vliv polymorfismu na reakci 104 pacientů léčených mnoha odlišnými způsoby antidepresivní léčby. Čtyři studie zaměřené na rozšíření S alely promotorové oblasti genu pro serotoninový transportér u pacientů s AN (Di Bella et al., 2000; Fumeron et al., 2001; Hinney et al., 1984; Sundaramurthy et al., 2000) odhalily vyšší výskyt S alely u pacientů než u kontrol ve všech čtyřech případech. Statisticky signifikantní spojitost mezi S alelou a AN odhalila ovšem pouze jedna studie. S alela promotorové oblasti genu pro serotoninový transportér snižuje transkripční aktivitu a vede k nižší expresi serotoninového transportéru (Heils et al.,

1996). Touto cestou se očekává ovlivnění efektu SSRI u PPP. Objasnění individuálně odlišné vnímavosti a odpovědi na léčbu, která je způsobena genetickými faktory predisponujícími jedince k odlišnostem v metabolismu léčiva, mohou v budoucnosti umožnit lepší využití medikamentů včetně SSRI. Genetický polymorfismus serotoninového transportéru může ovlivnit množství fenotypových projevů včetně anxiety, afektivních poruch a poruch PPP.

Otázka genetické vnímavosti k PPP není dořešena. Na manifestaci PPP se pravděpodobně podílí množství interagujících genetických složek, přičemž každá má mírný potenciál zvyšovat riziko PPP (Mazeo et al., 2009). Poruchy příjmu potravy vykazují navíc stále větší heterogenitu, což zvyšuje potřebu lépe definovat sledované fenotypy. Budoucí genetické studie onemocnění s multifaktoriální příčinou vzniku vyžadují přesnou a velmi důmyslnou fenotypizaci, která nemusí odpovídat současné klasifikaci (Mazzeo et al., 2009; Martásková a Papežová, 2005).

Většina studií byla prováděna v rámci Evropy, chybí studie se zaměřením na etnické vlivy. A samozřejmě nelze opomenout, že k různorodosti projevu genetické informace výrazně přispívá prostředí a je nemožné zcela oddělit vlivy prostředí a vlivy genetické (Bulik a Tozzi, 2004; Bulik, 2005; Kocourková et al., 1997).

Cílem psychiatrického výzkumu v genetice by měla být možnost identifikovat rizikové genetické profily pro rozvoj různých psychiatrických postižení (De Mooij-van Malsel et al., 2008; Kas et al., 2008; LaPorte et al., 2008; Monteleone a Maj, 2008). Tento přístup může, ale také nemusí, být otázkou vzdálené budoucnosti [5,8,19,26]. Genotypizace také nabízí možnost diferenciální indikace antidepresiv s různým mechanismem účinku a šetrnějšího přístupu k podávání léků, především stran možných vedlejších účinků nebo lékových interakcí (Benedetti et al., 2008; De Mooij-van Malsel et al., 2008; Gorwood, 2004; Monteleone a Maj, 2008).

## **6. SOUHRN VÝSLEDKŮ DISERTAČNÍ PRÁCE**

### 6.1. Publikace 1, *Folia Biologica* 55, 192-197, 2009

Serotoninergní receptory a transportéry patří k nejčastěji studovaným genům v souvislosti s onemocněním PPP. Asociace polymorfizmu serotoninového transportéru 5-HT2A s anorexií nervosa byla pozorována jako jedna z prvních (Hinney et al., 1997), donedávna však s ne zcela konzistentními výsledky. Naše studie zkoumala asociace tří polymorfizmů v kandidátních genech serotoninergní metabolické dráhy a jejich asociaci s onemocněním anorexia nervosa. Prvním byl SNP polymorfizmus -1438G/A v serotoninovém receptoru 5-HT2A; další dva polymorfizmy se lišily velikostí jednotlivých alel v genu pro serotoninový transportér 5-HTT (LPR a VNTR).

Výsledky genotypizace polymorfizmu -1438G/A v serotoninovém receptoru provedené ve skupině 75 pacientek s AN a 65 zdravých kontrol ukázaly výskyt alely A u 47 % pacientů s AN a u 42 % kontrol. Distribuce genotypů kopírovala trend mezinárodních studií s asociací rizikové alely A s onemocněním AN. Tyto výsledky byly zařazeny do širšího kontextu slovanské populace srovnáním s výsledky polské studie, které dosáhly podobného trendu častějšího výskytu alely A u pacientek s AN (65 % u pacientů a 57 % u kontrol). S ohledem na limitovanou velikost námi zkoumaného souboru byla provedena metaanalýza dostupných studií s dosažením významnosti asociace varianty -1438G/A s onemocněním AN  $p \leq 0,0003$ . Polymorfizmus serotoninového receptoru 5-HT2A je zkoumán také pomocí endofenotypů. Asociace -1438G/A s BMI či věkem nástupu onemocnění byla provedena také zahraničními studiemi (Kipman et al., 2002). Porovnání vztahu rizikové alely A s BMI v námi zkoumaném souboru pacientek s AN ukázalo hraniční významnost ( $p \leq 0,055$ ).

**Tabulka: Výsledky metaanalýzy asociačních studií analyzujících alelu -1438A genu 5-HT2A u nemocných s AN a kontrol. OR je prezentováno 95% intervalu spolehlivosti (<sup>A</sup>Rybakowski et al., 2006; <sup>B</sup>Gorwood et al., 2003).**

Populace	Skupina	A alela	G alela	P	OR	95 % CI	
						od	do
Česká	Pacienti	71	79	0.3992	1.2255	0.7636	1.9668
	Kontroly	55	75				
Polská <sup>A</sup>	Pacienti	170	92	0.0847	1.4087	0.9535	2.811
	Kontroly	101	77				
Slovanská (Česká + Polská)	Pacienti	241	171	0.0362	1.3732	1.0202	1.8484
	Kontroly	156	152				
9 předchozích analyzovaných souborů <sup>B</sup>	Pacienti	816	928	0.0043	1.20	1.07	1.35
	Kontroly	1443	1869				
9 předchozích souborů + Slované	Pacienti	1057	1099	0.0003	1.2156	1.0923	1.3528
	Kontroly	1599	2021				

Dalším ze zkoumaných genů a jeho variant byl gen pro serotoninový transportér 5-HTT, který je zodpovědný za vychytávání uvolněného serotoninu. 5-HTT se nachází v presynaptické membráně neuronu a je cílovým místem působení SSRI třídy antidepresiv. Gen kódující tento transportér má několik variabilních míst. Polymorfismus LPR (length polymorphic region) je lokalizovaný v promotorové části genu a má krátkou (S – short; 14 repetací) či dlouhou (L – long; 16 opakování) variantu. Funkční dopad výskytu jednotlivých alel na transkripci genu byl prokázán v *in vitro* studiích. Souvislost jednotlivých variant s psychickými onemocněními je srovnávána u pacientů s depresí či poruchami příjmu potravy, opět s různorodými závěry. Výsledky genotypování LPR polymorfismu v naší studii neprokázaly pozitivní asociaci s onemocněním anorexia nervosa ani v rámci endofenotypového přístupu souvislost s BMI. Naopak tyto výsledky ukazují negativní trend asociace LPR polymorfismu s onemocněním AN (OR = 0.7696;  $p \leq 0.2896$ ). Metaanalýza s účastí



pěti dalších studií (Gordwood et al., 2004; Rybakowski et al., 2006) způsobila snížení statistické významnosti i OR (podílu pravděpodobných výskytu u pacientů a kontrol) z 1.38 na 1.243. Výsledky české studie byly prováděny na souboru s toho času maximální možnou velikostí. Zajímavé bude sledovat trend asociací při navýšení, např. zdvojnásobení souboru. Rovněž lze očekávat další publikace v této oblasti na mezinárodním poli.

Další z polymorfizmů VNTR (variable nucleotide tandem repeats) genu 5-HTT je opět klasifikován na základě délkových repetací s 9, 10 a 12 opakováními. Stejně jako u LPR polymorfizmu délka jednotlivých opakování ovlivňuje míru transkripce genu. VNTR polymorfní oblast se nachází uvnitř 2. intronu genu 5-HTT. V námi zkoumaném souboru nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl v distribucích genotypů polymorfizmu VNTR mezi pacienty a kontrolami. Literární odkazy zabývající se variantou VNTR nejsou tak hojné jako výskyt studií o LPR polymorfizmu. Pro účely metaanalýzy nejsou dostupná data dostačující.

Údaje námi provedených asociačních studií a následné srovnání v mezinárodním kontextu potvrdily efekt rizikové alely A polymorfizmu -1438G/A u onemocnění anorexia nervosa. Naopak žádná asociace s onemocněním nebyla pozorována u obou zkoumaných polymorfizmů v serotoniném transportéru LPR či VNTR. Ačkoli výsledky genotypizace varianty LPR v námi zkoumaném souboru pacientek a kontrol nenašly žádnou asociaci, je to v souladu s jinými studiemi. Navzdory funkčním studiím popisujícím vliv variant LPR a VNTR na transkripci genu, výsledky asociačních studií v genu pro serotoninový transportér nejsou jednoznačné.

## 6.2. Publikace 2, *Folia Biologica*, 2013, in press

Stress a jeho vnímání hraje velmi důležitou úlohu v patogenezi onemocnění PPP. Téměř šestileté úsilí výběru, evaluace, sběru a vyhodnocování anonymizovaných dat pomocí stresových dotazníků vyústilo v práci zabývající se souhrami vlivů genů a prostředí (G x E). Soubor čítá 127 pacientů s AN a BN s průměrným věkem  $25 \pm 7$  let a 78 zdravých kontrol v průměrném věku  $26 \pm 5$  let. Vzhledem ke zjišťování vlivů prostředí byl kladen důraz také na srovnatelný socio-ekonomický status obou skupin.

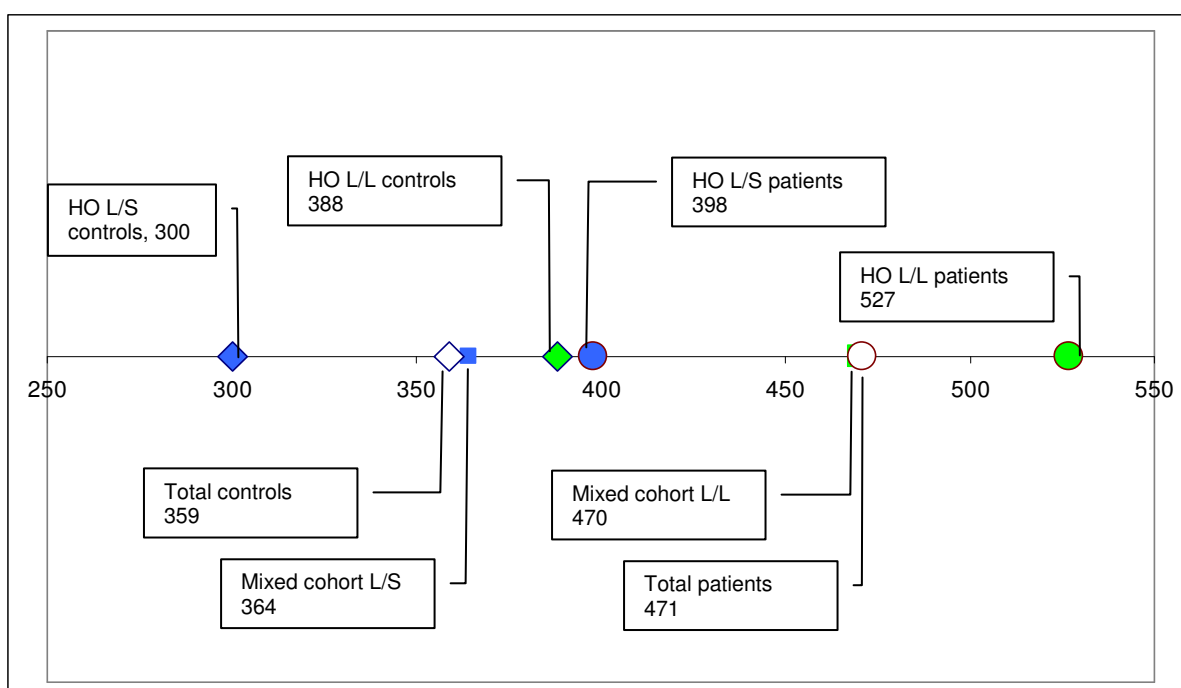
Vliv stresu byl zkoumán pomocí stresových dotazníků podle Rahe se zaměřením na mladé jedince (Rahe et al., 2000; Holmes and Rahe, 1967). Výhoda spočívá v použití mezinárodně validovaného dotazníku a jeho implementaci do výzkumu poruch příjmu potravy v rámci České republiky a zároveň v možné srovnatelnosti s daty v zahraničí v budoucnu. Zároveň byla zaručena anonymizace dotazníků, což zvyšuje důvěryhodnost a eliminuje potenciální odchylky nepravdivých odpovědí. Dotazníky představují účinný nástroj při zjišťování prožitých traumat či stresových událostí a napomáhají k fenotypizaci jednotlivých onemocnění. Zejména v psychiatrické genetice lze pozorovat jednotlivé projevy – např. úzkost, deprese či míru traumatizace napříč onemocněními (bipolární afektivní porucha, poruchy příjmu potravy atd.) (Brown et al., 2013). Vytváření klinických podskupin a mapování vlivů prostředí a jejich podíl na rozvoji choroby umožní blíže charakterizovat typ onemocnění u konkrétního pacienta a navrhnout vhodnou terapii (Bulik a Tozzi, 2004)

HO-1 je enzym ovlivňující velké množství signálních kaskád v buňce a to prostřednictvím svých reakčních produktů biliverdinu, železa a oxidu uhelnatého. HO-1 katalyzuje přeměnu hemu na biliverdin a zároveň indukuje antiproliferativní, antioxidantní a protizánětlivé procesy s výsledným efektem zachování buněčné, tkáňové i celkové homeostázy. V průběhu onemocnění AN či BN prokazatelně dochází k nedostatku výživových látek a naopak organismus je vystaven dlouhodobé stresové zátěži psychického i fyzického rázu. Polymorfismus v genu hemoxygenázy 1, nacházející se v promotorové oblasti přibližně 250 bp spočívá v různě dlouhé repetici GT nukleotidů s výsledným efektem ovlivnění exprese proteinu. Krátká alela S (obvykle klasifikována < 25 GT opakování) má vyšší úroveň exprese ve srovnání s delší alelou L ( $\geq 25$ ) (Hirai et al., 2003; Yamada et al., 2000; Grochot-Przeczek et al., 2012). Naše studie předpokládala ovlivnění celkového subjektivního stresu (data získaná z dotazníků) asociací s (GT) polymorfismem genu hemoxygenázy 1. Vycházeli jsme z dosavadních studií dokumentujících dopad genotypu HO-1 na metabolická onemocnění včetně obezity, diabetu 2. typu či hormonální regulaci (Abraham et al., 2008; Bakken et al., 1972; Abraham et al., 2007).

Dosažené výsledky ukazují, že genotyp L/L s nejmenší *in vitro* dokumentovanou expresí genu HO-1 koreluje s nejvyšší mírou stresového indexu u pacientek. Dále je patrná vzestupná tendence váženého, celkového i specifického stresového indexu v závislosti na genotypu HO-1 u pacientek i u kontrol. Nejnižší průměrný vážený stresový index měly kontroly s „protektivním“ s genotypem L/S; o něco vyšší index byl pozorován u kontrol s L/L genotypem. Následovaly pacientky s genotypem L/S a nejvyšší skóre bylo pozorováno u pacientek s „málo ochranným“

genotypem L/L (viz graf). Ke zjištění podílu vlivu genotypu na závažnost stresu bylo použito těchto několik stresových indexů pro zajištění interní validity a současné evaluace s dotazníky používanými mezinárodně. Zatímco vážený a celkový index stresu vychází z kumulace stresových situací v průběhu života, specifický stresový index byl navržen cíleně pro pacientky s PPP. Stejně jako ostatní subjektivní stresové indexy vycházel z Raheho dotazníku, byly ale vybrány otázky zaměřené na specifické faktory, které hrají významnou roli v závažnosti i léčbě PPP (rodinné vztahy, sexualita atd.).

**Graf: Objektivní stresový index v závislosti na GT repetici v genu HO-1 u pacientů a u kontrol znázorněn na horizontální ose**



Subjektivní stres představuje stres vnímaný samotnými pacientkami, který se dle klinických pozorování a našich výsledků významně liší od stresu objektivního stanoveného lékařem na základě anamnézy či terapeutickými rozhovory. Subjektivní stres byl ve všech třech vyjádřeních (celkový, specifický a vážený) vždy nižší u

zdravých kontrol ve srovnání s pacientkami. U pacientek dále ukázala Pearsonova korelace objektivního stresového indexu s celkovým (0,198), specifickým (0,287) a specifickým stresovým indexem (0,224), ( $p \leq 0,01$ ) nepříliš těsný vztah subjektivních stresových indexů s objektivními. Zajímavá je nejvyšší míra korelace objektivního a subjektivního hodnocení u specifického indexu, což vyplývá z podstaty jeho zaměření na PPP. Vzhledem k patogenezi PPP a její souvislosti s alterovaným vnímáním se jedná o potvrzení našich hypotéz. I když míra subjektivního stresu nereflektuje objektivní závažnost vystavení stresovým událostem, hraje zřejmě důležitou roli v ovlivnění metabolismu a následné reakci organismu na hormonální a metabolickou dysbalanci vyvolanou stresem. Posun subjektivního vnímání u pacientek s poruchami příjmu potravy je dobře dokumentován zejména u vnímání vlastního těla a zahrnuje i nevědomou složku vnímání sebe sama, což dokládá nedávno provedená studie pacientek s AN (Keizer et al., 2013).

Naše práce pojednává o vlivu genotypu a prostředí - polymorfizmu (GT)<sub>n</sub> v genu HO-1 a vnímáním stresu u pacientek s poruchami příjmu potravy a kontrol. Dle dostupných informací dosud nebyla publikována studie vlivu hemoxygenázy 1 na metabolismus u poruch příjmu potravy. Námi provedená studie představuje první zmínku o vlivu genu HO-1 a předpokládáme, že toto téma bude nadále rozvíjeno a studováno.

### **6.3. Publikace 3,**

Publikace představuje jednu z úvodních kapitol knihy, která shrnula současné znalosti o genetických vlivech na vznik, průběh a vyústění poruch příjmu potravy. Je určena nejen pro odborníky v oblasti příjmu potravy, ale i další specialisty, kteří se na interdisciplinární léčbě poruch příjmu potravy podílejí. Poukazuje na přítomnost genetických determinant u poruch příjmu potravy podobně jako u dalších psychiatrických diagnóz (deprese, obsedantně kompulsivní porucha, závislost na alkoholu) a udává odhadovaný podíl dědičnosti 56-84 % (Wade et al., 2000). Bylo již zkoumáno 128 různých polymorfizmů a 43 genů v asociačních studiích ve vztahu k jídelnímu chování, motivačním vzorcům i mechanismu odměny. Zdůrazňuje, že cílem dalšího psychiatrického výzkumu je identifikovat rizikové genetické profily k diferencovanějším postupům v komplexní terapii poruch příjmu potravy a preventivním, protektivním opatřením.

**Odkazy na problematiku, jejíž řešení bylo umožněno založením DNA banky nemocných s poruchami příjmu potravy a zdravých dobrovolníků. A) Český soubor nemocných byl zahrnut do významné celosvětové genetické studie. B) Odkaz na probíhající studii role BDNF v patogenezi PPP.**

**A)**

Boraska V, Franklin CS, Floyd JAB, Thornton LM, Laura LM, Southam L, Rayner WN, Tachmazidou I, Klump KL, Hudson JI, Treasure J, Lewis CM, Schmidt U, Tozzi F, Kiezebrink K, Hebebrand J, Gorwood P, Adan RAH, Kas MJH, Favaro A, Santonastaso P, Fernandez-Aranda F, Gratacos M, Rybakowski F, Dmitrzak-Weglarz M, Kaaprio J, Keski-Rahkonen A, Reavouri A, Van Furth EF, Slof-O'pt Landt MCT, Reichborn-Kejnnerud T, Knudsen GP, Monteleone P, Kaplan AS, Karwautz A, Hakonarson H, Berrettini WH, Guo Y, Li D, Schork N, Komaki G, Ando T, Inoko H, Esko T, Fischer K, Männik K, Metspalu A, Baker JH, Cone RD, Dackor J, DeSocio JE, Hilliard CE, O'Toole J, Pantel J, Szatkiewicz JP, Taico C, Trace SE, Davis O, Helder S, Buehren K, Burghardt R, de Zwann M, Egberts K, Ehrlich S, Herpertz-Dahlmann B, Herzog W, Imgart H, Scherag A, Scherag S, Zipfel S, Boni C, Ramos N, Versini A, Brandys MK, Danner UN, de Kovel C, Hendriks J, Koeleman BPC, Ophoff RA, Strengman E, van Elburg AA, Bruson A, Clementi M, Degortes D, Forzan M, Tenconi E, Martinez DE, Escaramís G, Jiminez-Murcia S, Lissowska J, Rajewski A, Szeszenia-Dabrowska N, Slopian A, Karhunen L, Meulenbelt I, Slagboom PE, Tortorella A, Maj M, Dedoussis G, Dikeos D, Gonidakis F, Tziouvas K, Tsitsika A, Papežova H, Slachtova L, **Martaskova D**, Kennedy J, Levitan R, Yilmaz Z, Huemer J, Koubek D, Merl E, wagner G, Lichtenstein P, Breen G, Cohen-Woods S, Rarner A, Mc Guffin P, Cichon S, Geigling I, Herms S, Rujescu D, Schreiber S, Wichmann H-E, Dina C, Sladek R, Gambaro G, Soranzo N, Julia A, Marsal S, Janssen RR, Gaborieau V, Dick D, Palotie A, Samuli R, Widén E, Andreasson OA, Espeseth T, Lundervold A, Reinvang I, Steen VM, Le Hellard S, Mattingsdal M, Ntalla I, Bencko V, Foretova L, Janout V, Navratilova M, Gallinger S, Marshall C, Pinto D, Scherer S, Aschauer H, Carlberg L, Schlosser-Haupt A, Alfredsson L, Ding B, Klareskog L, Padyukov L, Logan DW, Peltonen L, Ritchie GRS, Barrett

JC, The Wellcome Trust Case Control Consortium, Estivill X, Hinney A, Sullivan PF, Collier D, Zeggini E, Bulik CM.  
A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, *in admission (revised resubmission, IF 2012 = 14,897)*

**B)**

Papežová a kol. The role of genotypes of BDNF in anorexia and bulimia nervosa subtypes phenotypization. (*Publikace v přípravě, plánováno zaslání do časopisu Journal of Psychiatric Research, IF = 4,066*)

Papezova H, Slachtova L, **Martaskova D**, Yamamotova A, Martasek P: Pathologic self-perception and G196A polymorphisms in BDNF gene in patients with eating disorders. 10<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP 2011). Prague, Czech Republic, May 29 – Jun 2, 2011.



Boraska V, Franklin CS, Floyd JAB, et al. A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, *in admission (revised resubmission, IF 2012 = 14,897)*

Díky vybudování doposud nejrozsáhlejší DNA banky s poruchami příjmu potravy ve střední Evropě se podařilo přispět k výzkumu vlivu genetického rizika ve vnímavosti k AN a BN na mezinárodní úrovni. Tato DNA banka byla zahrnuta rovněž do celosvětové databáze (účastní se 16 zemí Evropy, USA a Kanada) nemocných s poruchami příjmu potravy GWAS (Genome-Wide Association Study for AN, založené v roce 2007 a koordinované ředitelkou genetického konsorcia GCAN (Genetic Consortium for Anorexia Nervosa) prof. Dr. Cynthií Bulik z University of North Carolina v Chapel Hill, NC, USA a prof. Davidem Collierem z Kings College London, Institute of Psychiatry, London, UK <http://www.iop.kcl.ac.uk/virtual/?path=/about/how-to-find-the-institute-of-psychiatry/>.

Celkem bylo zasláno 4015 DNA vzorků pacientů s AN (z nichž bylo 3687 zasláno ke genotypizaci, uskutečněné u 2978 vzorků a 4015 kontrol). Připravovány jsou i sekundární analýzy, včetně analýz závažných psychiatrických onemocnění zařazených do podobně získaných souborů (cross disorder analyse). Pod vedením mezinárodního Psychiatrického genetického konsorcia bude s AN analyzována sledovaná bipolární afektivní porucha, autismus, ADHD, depresivní porucha, schizofrenie, OCD i obezita. Další publikační činnost skupiny WTCCC3 (Wellcome Trust Case Control Consortium pro Anorexia nervosa), která zahrnuje GCAN, se bude řídit přísnými dohodnutými pravidly s uvedením všech přispívajících autorů všech zemí s příslušnými dedikacemi. Kontrola kvality postupů a kvalita dalšího zpracování dat bude zabezpečena The Wellcome Trust Sanger Institutem - <http://www.sanger.ac.uk/research/projects/appliedstatisticalgenetics>.

Papezova H, Slachtova L, **Martaskova D**, Yamamotova A, Martasek P: Pathologic self-perception and G196A polymorphisms in BDNF gene in patients with eating disorders. 10<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP 2011). Prague, Czech Republic, May 29 – Jun 2, 2011.

Prezentuji abstrakt z výše uvedené konference (poster, viz Příloha 3):

Eating disorders (ED), especially Anorexia Nervosa (AN), are the serious psychiatric disorders characterized by pathological eating pattern and one's own body perception, inability to maintain stable normal body weight and obsessive fear of becoming overweight. The clear genetic component of these multifactorial diseases has been observed. In the context of neurotransmitter serotonin and dopamine pathways, the G196A polymorphism in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene has been investigated. BDNF is responsible for normal expression of dopamine D3 receptors in nucleus accumbens which affect the behavior sensitivity including anxiety and distorted body perception. The DNA samples, stress and EDE-Q questionnaires of 110 patients with anorexia nervosa and matching controls were analysed. Mann-Whitney test for the calculation of BDNF genotype and pathologic self-perfection has been used with the significant results for G/A genotype in self-perfection focused questions. Here we demonstrate, that G196A polymorphism in BDNF gene may be associated with the pathological self-perfection in patients with eating-disorders.

## **7. PŘEDPOKLADY PRO DALŠÍ ROZVOJ DISCIPLÍNY**

### **VÝHLEDY DO BUDOUCNA**

Spektrum poruch příjmu potravy (PPP), s nejzávažnější mentální anorexií (AN) a bulimií (BN), představuje kontinuum onemocnění s abnormálním potravním chováním (extrémním hladověním a/nebo přejídáním s kompenzatorním chováním) a s patologickým zaměřením na štíhlost a vnímáním vlastního těla (DSM-IV). Mortalita je nejvyšší z psychiatrických pacientů. Příbuzní probandů mají riziko onemocnění 10x vyšší než příbuzní zdravých kontrol. Předchozí studie dvojčat a rodin ukázaly vliv dědičnosti u AN v 56 %, zbylá variance byla přičítána sdíleným (5 %) a nesdíleným (39 %) vlivům enviromentálním. S extrémně narůstající problematikou obezity se mění i průběh poruch příjmu potravy a posledních 15 let i vzrůstá počet společných molekulárně genetických studií zaměřených na regulaci energetického metabolismu, na neuropeptidy – neurotransmitery peptidového charakteru ovlivňující nervovou činnost a funkci. Některé z nich mají zároveň charakter hormonů, např. v trávicím ústrojí, tukové tkáni (neuropeptid Y, leptin, ghrelin, cholecystokin, adiponectin, resistin) (Dolinkova et al., 2006; Beranová et al., 2009; Smitka et al., 2011; Méquinion et al., 2013). Ukázalo se ale, že genetické studie vyžadují sofistikovanější fenotypizaci, která neodpovídá vždy aktuální klasifikaci. Bulik et al. 2007 definovali endofenotypy jako měřitelné neurofyzilogické koreláty, které jsou nezávislé na stavu a objevují se i u rodinných příslušníků více než v populaci (Kendler a Neale, 2010). Takovými faktory mohou být vnímání bolesti i vlastního těla a hyperaktivní a autoagresivní chování. Jejich sledování zlepšuje identifikaci jednotlivých subtypů onemocnění a může predikovat jejich průběh (např. přechod mezi subtypy onemocnění - nejčastěji AN-BN- psychogenní přejídání).

V předchozích studiích jsme se zaměřili především na geny centrálně ovlivňující příjem potravy a stresové a autoagresivní faktory: serotoninové, neurotrofní faktory (BDNF). Studie je systematickým hodnocením genetického

environmetálního profilu nemocných s poruchami příjmu potravy v České republice. Výsledky přinesou cenné informace a porovnání pečlivě vytypovaných endofenotypů může ozřejmit různý průběh choroby s potenciální terapeutickou reflexí. Z výsledků exomového sekvenování několika postižených rodin s poruchami příjmu potravy mohou vzejít nálezy nových genů podílejících se na vzniku PPP a potažmo zúčastněných, dosud nerozkrytých, metabolických drah.

Dlouhodobý sběr fenotypových (dotazníky) a genotypových dat představuje široce pojatý přístup v rámci dobře charakterizovaného souboru a skýtá možnosti následných včetně nově objevených charakterizací endofenotypů. Na základě výsledků genových asociačních studií včetně poslední studie mapující G x E korelaci (Publikace 5.2.), je možné dále zkoumat přímý dopad genové exprese na úrovni biochemické, endokrinologické a fyziologické, měřením aktivit jednotlivých proteinů. Metabolické či fyziologické parametry mohou být dále využity k bližší specifikaci fenotypů – např. v souvislosti s nástupem onemocnění, vnímáním vlastního těla, bolesti atd.

Dlouhodobě chceme posoudit interakce rizikových faktorů prostředí (stresu) a genetických faktorů. Jejich objasnění lze využít ve stanovení protektivních preventivních faktorů především v ohrožené populaci adolescentů. V současné době probíhá studie GWAS u anorexie (Genome-wide association studies), do které tým už také přispěl a bude dál spolupracovat se širokým mezinárodním konsorciem. Celogenomový přístup k analýzám multifaktoriálních onemocnění, jako jsou poruchy příjmu potravy, je, vzhledem ke stále větší dostupnosti těchto technologií, jednou z prioritních analýz. Zároveň klade vysoké nároky na množství a kvalitu vstupních dat a intenzivní konzorciální spolupráci. Zatímco v roce 2008 bylo publikováno 592 studií zaměřených na Genome wide association studies (GWAS) a v roce 2007 jen zhruba

polovina, v dalších letech zájem o tuto problematiku zaznamenal prudký nárůst (2010 bylo publikováno téměř 2700 studií a v loňském roce 3245 studií). Přístup spočívá v mapování SNP a CNV pomocí microarray technologií a v následném vyhodnocování s využitím bioinformatiky. Potenciál těchto metod je obrovský a GWAS jsou předstupněm pro navázání studií jednotlivých kandidátních genů, jejich funkce a charakterizaci jejich proteinů (Dmitrzak-Weglarz et al., 2013).

## **8. PUBLIKAČNÍ ČINNOST**

### **8.1. Publikace v časopisech s IF**

8.1.1. **Martásková D**, Šlachtová L, Kemlink D, Záhoráková D, Papežová H: Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies. *Folia Biologica* 55, 192-197, 2009 (*IF* = 0,924)

8.1.2. Šlachtová L, **Kaminska D**, Chval M, Králík L, Martásek P, Papežová H: Stress perception and (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphism in HO-1 gene are both risk factors in eating disorder development. *Folia Biologica*, *in press*, (*IF* 2012 = 1,219)

8.1.3. Boraska V, Franklin CS, Floyd JAB, et al. A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, *in admission (revised resubmission, IF* 2012 = 14,897)

### **8.2. Publikace knižní nebo samostatné kapitoly v knize**

8.2.1. **Martásková D**, Papežová H: Genetické aspekty poruch příjmu potravy *In*: Papežová a kol. Spektrum poruch příjmu potravy, Grada 2010, 56-61.

### **8.3. Rukopisy v přípravě**

8.3.1. Papežová a kol. The role of genotypes of BDNF in anorexia and bulimia nervosa subtypes phenotypization. (*Publikace v přípravě, plánováno zaslání do časopisu Journal of Psychiatric Research, IF* = 4,066)

### **8.4. Abstrakta z mezinárodních konferencí**

8.4.1. **Martaskova D**, Slachtova L, Papezova H.: Anorexia nervosa – Search for genetic determinants and HSP70 gene polymorphisms. 1st International Conference of the Cyprus Society of Human Genetics, Nicosia, Cyprus, October 3-4, 2008

8.4.2. **Martaskova D**, Slachtova L, Kemlink D, Zahorakova D, Martasek P, Papezova H: Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies. 4th International Conference on Genomics, Shenzhen, China, November 2-5, 2009

8.4.3. **Martaskova D**, Slachtova L, Kemlink D, Záhoráková D, Martasek P, Papezova H: Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies, 1st Intact Symposium, Braga, Portugal, November 11-15, 2009

8.4.4. Slachtova L, **Martaskova D**, Kemlink D, Martasek P, Papezova H.: Serotonin-related genes in anorexia nervosa. Meta-analyses and Czech population study.



Annual Symposium, Society of the Study of Inborn Errors of Metabolism, Istanbul, Turkey, 31.8. – 3.9. 2010. J Inherit Metab Dis, 33 (Suppl 1): S166-S166, 2010

8.4.5. Slachtova L, **Martaskova D**, Kemlink D, Yamamotova A, Martasek P, Papezova H: Clinical and genetic correlates of body perception in patients with eating disorders. 15<sup>th</sup> World Congress of Psychiatry, Buenos Aires, Argentina, September 18. – 22. 2011.

8.4.6. Papezova H, Slachtova L, **Martaskova D**, Yamamotova A, Martasek P: Pathologic self-perception and G196A polymorphisms in BDNF gene in patients with eating disorders. 10<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP 2011). Prague, Czech Republic, May 29 – Jun 2, 2011.

8.4.7. Papezova H, Kralik L, Slachtova L, **Martaskova D**, Chval M, Martasek P: Haemoxygenase 1 promoter polymorphism (GT) in Anorexia and Bulimia nervosa, World Congress of Biological Psychiatry, 23. – 27. 6. 2013, Kyoto, Japan

### **8.5. Abstrakta z národních konferencí**

8.5.1. Papežová H, **Martásková D**, Šlachťová L, Záhoráková D: Anorexia nervosa – Genetické determinanty a vlivy okolí (polymorfismus serotoninového receptoru a transportéru). 14. Celostátní konference biologické psychiatrie s mezinárodní účastí, Luhačovice, ČR 10.- 13. červen 2009

8.5.2. **Martásková D**, Šlachťová L, Papežová H: Genetické determinanty anorexia nervosa a polymorfismus genu HSP70, Psychiatrie pro praxi. 2009, roč. 10, Suppl. B, s. 27

8.5.3. Šlachťová L, Yamamotová A, Uhlíková P, **Martásková D**, Papežová H: Klinické a genetické koreláty vnímání vlastního těla u pacientek s poruchami příjmu potravy. Psychiatrie, 2011, 15, Suppl.1, Abstrakta. 53. Čs.- sl. psychofarmakologická konference, Jeseník, 5.-9. leden 2011, pp. 55-55.

8.5.4. Šlachťová L, **Martásková D**, Martásek P, Yamamotová A, Papežová H: Body and Brain. Pathological Body Perception and BDNF polymorphism in Patients with Eating Disorders. 2<sup>nd</sup> Intact Symposium a VIII. Mezinárodní konference o poruchách příjmu potravy a obezitě, Prague 3. - 5. 3. 2011, Abstrakt Book, p.101.

## 8.6. Citační ohlas publikace 1 (Převzato z Web of Science)

Title: **Polymorphisms in Serotonin-Related Genes in Anorexia Nervosa. The First Study in Czech Population and Meta-analyses with Previously Performed Studies**

Author(s): *Martaskova, D.; Slachtova, L.; Kemlink, D.; Zahorova, D., Papezova, H.*

Source: FOLIA BIOLOGICA Volume: 55 Issue: 5 Pages: 192-197 Published: 2009

This item has been cited by items indexed in the databases listed below:

8 in All Databases

**7 publication in Web of Science**

1. Title: [The Genetics of Eating Disorders](#)  
Author(s): Trace, Sara E.; Baker, Jessica H.; Peñas-Lledó, Eva.; Bulik, Cynthia M.  
Source: ANNUAL REVIEWS OF CLINICAL PSYCHOLOGY Volume 9 Pages: 589-620 DOI: 10.1146/annurev-clinpsy-050212-185546 Published: 2013
2. Title: [Multiple Regulatory Variants Modulate Expression of 5-Hydroxytryptamine 2A Receptors in Human Cortex](#)  
Author(s): Smith, Ryan M.; Papp, Audrey C.; Webb, Amy; et al.  
Source: BIOLOGICAL PSYCHIATRY Volume 73 Issue: 6 Pages: 546-554 DOI: 10.1016/j.biopsych.2012.09.028 Published: MAR 15 2013
3. Title: [Serotonin neurotransmission in anorexia nervosa](#)  
Author(s): Haleem, Darakhshan Jabeen  
Source: BEHAVIOURAL PHARMACOLOGY Volume: 23 Issue: 5-6 Pages: 478-495 DOI: 10.1097/FBP.0b013e328357440d Published: SEP 2012
4. Title: [Antipsychotic Agents in the Treatment of Anorexia Nervosa: Neuropsychopharmacologic Rationale and Evidence from Controlled Trials](#)  
Author(s): Brewerton, Timothy D.  
Source: CURRENT PSYCHIATRY REPORTS Volume: 14 Issue: 4 Pages: 398-405 DOI: 10.1007/s11920-012-0287-6 Published: AUG 2012
5. Title: [Examining associations between disordered eating and serotonin transporter gene polymorphisms](#)  
Author(s): Munn-Chernoff, Melissa A.; McQueen, Matthew B.; Stetler, Gary L.; et al.  
Source: INTERNATIONAL JOURNAL OF EATING DISORDERS Volume: 45 Issue: 4 Pages: 556-561 DOI: 10.1002/eat.22001 Published: MAY 2012
6. Title: [Food Addiction and Obesity: Evidence from Bench to Bedside](#)  
Author(s): Liu, Yijun; von Deneen, Karen M.; Kobeissy, Firas H.; et al.  
Source: JOURNAL OF PSYCHOACTIVE DRUGS Volume: 42 Issue: 2 Pages: 133-145 Published: JUN 2010
7. Title: [Genetic Findings in Anorexia and Bulimia Nervosa](#)  
Author(s): Hinney, Anke; Scherag, Susann; Hebebrand, Johannes  
Book Editor(s): Bouchard, C  
Source: GENES AND OBESITY Book Series: Progress in Molecular Biology and Translational Science Volume: 94 Pages: 241-270 DOI: 10.1016/S1877-1173(10)94009-X Published: 2010

## **9. BIBLIOGRAFIE**

Abraham, N. G., Brunner, E. J., Eriksson, J. W., Robertson, R. P. (2007) Metabolic syndrome: psychosocial, neuroendocrine, and classical risk factors in type 2 diabetes. *Ann. NY Acad. Sci.* 1113, 256-275.

Abraham, N. G., Kappas, A. (2008) Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol. Rev.* 60, 79-127.

Archer, T., Oscar-Berman, M., Blum, K., Gold, M. (2013) Epigenetic Modulation of Mood Disorders. *J Genet Syndr Gene Ther.* 4, pii: 1000120.

Akkermann, K., Paaver, M., Nordquist, N., Orelund, L., Harro, J. (2008) Association of 5-HTT gene polymorphism, platelet MAO activity, and drive for thinness in a population-based sample of adolescent girls. *Int. J. Eat. Disord.* 41, 399-404.

Alda, M., Dvorakova, M., Zvolsky, P., Papezova, H., Posmurova, M. (1989) Genetic aspects in chronic schizophrenia. Morbidity risks and contributory factors, *Schiz. Res.* 2, 339-344.

American Psychiatric Association (2000) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th ed. rev. Washington, DC: American Psychiatric Association 887, 539-550.

Ando, T., Ishikawa, T., Hotta, M., Naruo, T., Okabe, K., Nakahara, T., Takii, M., Kawai, K., Mera, T., Nakamoto, C., Takei, M., Yamaguchi, C., Nagata, T., Okamoto, Y., Ookuma, K., Koide, M., Yamanaka, T., Murata, S., Tamura, N., Kiriike, N., Ichimaru, Y., Komaki, G. (2012) Japanese Genetic Research Group For Eating Disorders. No association of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with anorexia nervosa in Japanese. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 159B, 48-52

Baan, C., Peeters, A., Lemos, F., Uitterlinden, A., Doxiadis, I., Claas, F., Ijzermans, J., Roodnat, J. M., Weimar, W. (2004) Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts. *Am. J. Transplant.* 4, 811-818.

Benedetti, F., Barbini, B., Bernasconi, A., Fulgosi, M. C., Colombo, C., Dallaspecia, S., Gavinelli, C., Marino, E., Pirovano, A., Radaelli, D., Smeraldi, E. (2008) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene variants influence antidepressant response to repeated total sleep deprivation in bipolar depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 1863-1866.

Beranová L., Sedláčková D., Kopečková J., Hainer V., Papežová H., Kvasničková H, Nedvídková J.(2009) Plazmatické hladiny neuropeptidu Y, ghrelinu a leptinu u pacientek s anorexia nervosa a jejich změny po šestitýdenní realimentaci. *Vnitř Lék* 55, 925-928.

Berg, K., Peterson, C., Frazier, P, Crow, S. (2012) Psychometric evaluation of the eating disorder examination and eating disorder examination-questionnaire: A systematic review of the literature. *Int. J. Eat. Dis.* 45, 428 - 438.

Bergen, A. W., van den Bree, M. B., Yeager, M., Welch, R., Ganjei, J. K., Haque, K., Bacanu, S., Berrettini, W. H., Grice, D. E., Goldman, D., Bulik, C. M., Klump, K., Fichter, M., Halmi, K., Kaplan, A., Strober, M., Treasure, J., Woodside, B., Kaye, W. H. (2003) Candidate genes for anorexia nervosa in the 1p33-36 linkage region: Serotonin 1D and delta opioid receptor loci exhibit significant association to anorexia nervosa. *Mol. Psychiatry* 8, 397-406.

Betancur, C., Corbex, M., Spielwoy, C., Philippe, A., Laplanche, J. L., Launay, J. M., Gillberg, C., Mouren-Siméoni, M. C., Hamon, M., Giros, B., Nosten-Bertrand, M., Leboyer, M. (2002). Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. *Mol. Psychiatry* 7, 67-71.

Birmingham, C., Su, J., Hlynsky, J., Goldner, E., Gao, M. (2005) The mortality rate from anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* 38, 143-146.

Bland, J. M., Altman, D. G. (2000) Statistics notes: The odds ratio, *Br. Med. J.* 320, 1468-1468.

Bodell, L. P., Hames, J. L., Holm-Denoma, J. M., Smith, A. R., Gordon, K. H., Joiner, T.E. (2012) Does the stress generation hypothesis apply to eating disorders?: An examination of stress generation in eating, depressive, and anxiety symptoms, *J. Affect. Dis.* 142, 139-142.

Brooks, S. J., Rask-Andersen, M., Benedict, C., Schioth, H. B. (2012) A debate on current rating disorder diagnoses in light of neurobiological findings: is it time for a spectrum model? *BMC Psychiatry* 12, 76, 2-11.

Bulik, C. M., Sullivan, P. F., Wade, T. D., Kendler, K. S. (2000) Twin studies of eating disorders: a review. *Int. J. Eat. Disord.* 27, 1-20.

Bulik, C. M., Tozzi, F. (2004) Genetics in eating disorders: state of science. *CNS Spektrum* 9, 511-515.

Bulik, C. M. (2005) Genes and environment in eating disorders What patients, families and practitioners need to know. *Česká a slovenská psychiatrie*, S1, 15.

Bulik, C. M., Sullivan, P. F., Tozzi, F., Furberg, H., Lichtenstein, P., Pedersen, N. L. (2006) Prevalence, heritability, and prospective risk factors for anorexia nervosa. *Arch. Gen. Psychiatry* 63,305–31.

Bulik, C. M., Hebebrand, J., Keski-Rahkonen, A., Klump, K. L., Reichborn-Kjennerud, T., Mazzeo, S. E., Wade T. D. (2007) Genetic epidemiology, endophenotypes, and eating disorder classification. *Int. J. Eat. Disord.* 40, S52–S60.

Campbell, D. A., Sundaramurthy, D., Marlham, A. F., Pieri, L. F. (1998) Lack of association between 5-HT2A gene promoter polymorphism and susceptibility to anorexia nervosa. *Lancet* 351, 499-499.

Cash T. F. and Deagle E. A. (1997) The nature of extent of body-image disturbances in anorexia and bulimia nervosa:a meta-analysis. *Int. J. Eat. Disord.* 22, 107-25.

Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H., McClay, J., Mill, J., Martin, J., Braithwaite, A., Poulton, R. (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301, 386-389.

Collier, D. A., Arranz, M. J., Li, T., Mupita, N., Treasure, J. (1997) Association between the 5HT2A gene promoter polymorphism and anorexia nervosa. *Lancet* 350, 412-412.

Crisp, A. H., Hsu, L. K., Harding, B., Hartshorn, J. (1980) Clinical feature of anorexia nervosa. A study of a consecutive series of 102 female patients. *J. Psychosom. Res.* 24, 179-191.

De Mooij-van Malsel, A. J. G., Olivier, B., Kas, M. J. H. (2008) Behavioural genetics in mood and anxiety: A next step in finding novel pharmacological targets. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 436-440.

Denschlag, D., Marculescu, R., Unfried, G., Hebler, L. A., Exner, M., Hashemi, A., Riener, E. K., Keck, C., Tempfer, C. B., Wagner, O. (2004) The size of a microsatellite polymorphism of the haem oxygenase 1 gene is associated with idiopathic recurrent miscarriage. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 211-214.

Di Bella, D. D., Catalano, M., Cavallini, M. C., Riboldi, C., Bellodi, L. (2000) Serotonin transporter linked polymorphic region in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Mol. Psychiatry* 5, 233-234.

DiNicola, V. F. (1990) Anorexia Multiforme: Self-starvation in historical and cultural context. Part I and II. Anorexia nervosa as a culture – reactive syndrome. *Transcultural Psychiatric Research Review*, Self-starvation as a Historical Chameleon 17 and 27, 165-196, 245-286.

Dmitrzak-Weglarz, M., Moczko, J., Skibinska, M., Slopian, A., Tyszkiewicz, M., Pawlak, J., Zaremba, D., Szczepankiewicz, A., Rajewski, A., Hauser, J. (2013) The study of candidate genes related to the neurodevelopmental hypothesis of anorexia

nervosa: Classical association study versus decision tree. *Psychiatry Research* 206, 117-121.

Dolinková M., Křížová J., Lacinová Z., Doležalová R., Housová J., Krajíčková J., Bošanská L., Papežová H., Haluzík M. (2006) Polymorfismy genů pro adiponektin a rezistin u pacientek s mentální anorexií a obezitou – pilotní studie. *Čas. Lék. čes.* 145, 562-566.

Dudbridge, F. (2003) Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet. Epidemiol.* 25, 115-221.

Enoch, M. A., Kaye, W. H., Rotondo, A., Greenberg, B. D., Murphy, D. L., Goldman, D. (1998) 5-HT2A promoter polymorphism - 1438G/A, anorexia nervosa, and obsessive-compulsive disorder. *Lancet* 351, 1785-1786.

Exner, M., Minar, E., Wagner, O., Schillinger, M. (2004) The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1097-1104.

Exner, M., Raith, M., Holzer, G., Gmeiner, B., Wagner, O., Kapiotis, S. (2006) Anti-inflammatory mechanisms of the Tibetan herbal preparation Padma 28 in the vessel wall. *Forsch. Komplex. Med.* 13, 13-17.

Faiburn, C. G., Harrison, P. J. (2003) Eating disorders. *Lancet* 361, 407-416.

Fairburn, C.G., Beglin, S.J. (1994) Assessment of eating disorders: interview or self-report questionnaire? *Int J Eat Disord.* 16: 363-370.

Faienza, M. F., Francavilla, R., Goffredo, R., Ventura, A., Marzano, F., Panzarino, G., Marinelli, G., Cavallo, L., Di Bitonto, G. (2012) Oxidative stress in obesity and metabolic syndrome in children and adolescents. *Horm. Res. Paed.* 78, 158-164.

Fichter, M. M., Noegel, R. (1980) Concordance for bulimia nervosa in twins. *Int. J. Eat. Dis.* 9, 255-263.



Fumeron, F., Botoulle, D., Aubert, R., Herbeth, B., Siest, G., Rigaud, D. (2001) Association of a functional 5-HT transporter gene polymorphism with anorexia nervosa and food intake. *Mol. Psychiatry* 6, 9-10.

Gorwood, P., Kipman, A., Foulon, Ch. (2003) The human genetics of anorexia nervosa, *Eur. J. Pharmacol.* 480, 163– 170.

Gorwood, P. (2004) Eating disorders, serotonin transporter polymorphisms and potential treatment response. *Am. J. Pharmacogenomics* 4, 9-17.

Gotoh, K., Masaki, T., Chiba, S., Ando, H., Fujiwara, K., Shimasaki, T., Mitsutomi, K., Katsuragi, I., Kakuma, T., Sakata, T., Yoshimatsu, H. (2013) Brain-derived neurotrophic factor, corticotropin-releasing factor, and hypothalamic neuronal histamine interact to regulate feeding behavior. *J Neurochem.* 125, 588-598.

Gregorek, A. C., Gornik, K. C., Polancec, D. S., Dabelic, S. (2013) GT microsatellite repeats in the heme oxygenase-1 gene promoter associated with abdominal aortic aneurysm in Croatian patients. *Biochem. Genet.* 51, 482-492.

Grochot-Przeczek, A., Dulak, J., Jozkowicz, A. (2012) Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clin. Sci.* 122, 93-103.

Hague, Z., Akbar, N., Yasmin, F., Haleem, M. A., Haleem, D.J. (2013) Inhibition of immobilization stress-induced anorexia, behavioral deficits, and plasma corticosterone secretion by injected leptin in rats. *Stress* 16, 353-62.

Harris, E. C., Barraclough, B. (1998) Excess mortality of mental disorder. *The British Journal of Psychiatry* 173, 11-53.

Hebebrand, J. & Remschmidt, H. (1995). Anorexia nervosa viewed as an extreme weight condition: genetic implications. *Human Genetics* 95, 1-11.

Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, K. P. (1996) Allelic variation of human serotonin transporter gene expression, *J. Neurochem.* 66, 2621-2624.

Heiman, M. L., Ahima, R. S., Craft, L. S., Schoner, B., Stephens, T. W., Flier, J. S. (1997) Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 138, 3859-63.

Heinz, A., Braus D. F., Smolka, M. N., Wrase, J., Puls, I., Hermann, D., Klein, S., Grusser, S. M., Flor, H., Schumann, G., Mann, K., Buchel, C. (2005) Amygdala-prefrontal coupling depends on a genetic variation of the serotonin transporter. *Nat. Neurosci.* 1, 20-21.

Hinney, A., Barth, N., Ziegler, A., von Prittwitz, S., Hamann, A., Hennighausen, K., Pirke, K. M., Heils, A., Rosenkranz, K., Roth, H., Coners, H., Mayer, H., Herzog, W., Siegfried, A., Lehmkuhl, G., Poustka, F., Schmidt, M. H., Schäfer, H., Grzeschik, K. H., Lesch, K. P., Lentes, K. U., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (1997) Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: allele distributions in relationship to body weight and in anorexia nervosa. *Life Sci.* 61, 295-303.

Hinney, A., Ziegler, A., Nothen, M. M., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (1997) 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene polymorphisms, anorexia nervosa, and obesity. *Lancet* 350, 1324-1325.

Hirai, H., Kubo, H., Yamaya, M., Nakayama, K., Numasaki, M., Kobayashi, S., Suzuki, S., Shibahara, S., Sasaki, H. (2003) Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 102, 1619-1621.

Holmes, T., Rahe, R. (1967) The social readjustment rating scale. *J. Psychosom. Res.* 11, 213-218.

Holland, A. J., Hall, A., Murray, R., Russell, G. F., Crisp, A. H. (1984) Anorexia nervosa: a study of 34 twin pairs and one set of triplets. *Br. J. Psychiatry* 145, 414-419.

Hsu, L. K. G. (1990) Eating disorders, *Guilford Press*, New York.

Hudson, J. et al. (1983) Family history study of anorexia nervosa and bulimia. *Br. J. Psychiatry* 142, 33, 133-138.

Chen, Y. H., Lin, S.J., Lin, M.W., Tsai, H.L., Kuo, S.S., Chen, J.W., Charng, M.J., Wu, T.C., Chen, L.C., Ding, Y.A., Pan, W.H., Jou, Y.S., Chau, L.Y. (2002) Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum. Genet.* 111, 1-8.

Johnson, J. G., Cohen, P., Kasen, S., Brook, J.S. (2002) Childhood adversities associated with risk for eating disorders or weight problems during adolescence or early adulthood. *Am. J. Psych.* 159, 394-400.

Kas, M. J. H., Kaye, W. H., Mathes W. F., Bulik, C. M. (2008) Interspecies genetics of eating disorder traits. *Am. J. Med. Genet. Part B*, 150B, 318-327.

Kaye, W. (2008) Neurobiology of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Physiol. Behav.* 94, 121-35.

Keizer, A., Smeets, M.A., Dijkerman, H.C., Uzunbajakau, S.A., van Elburg, A., Postma, A. (2013) Too fat to fit through the door: first evidence for disturbed body-scaled action in anorexia nervosa during locomotion. *PLoS One* 8: e64602.

Kendler, K. S., Neale M. C. (2010) Endophenotype: a conceptual analysis. *Molecular Psych.* 15, 789-797.

Kim, D. K., Lim, S. W., Lee, S., Sohn, S. E., Kim, S., Hahn, C. G., Carroll, B. J. (2000) Serotonin transporter gene polymorphism and antidepressant response. *Neuroreport* 11, 215-219.

Kim, Y., Trace, S. E., Crowley, J. J., Brownley, K. A., Hamer, R. M., Pisetsky, D. S., Sullivan, P. F., Bulik, C. M. (2013) Assessment of gene expression in peripheral blood using RNAseq before and after weight restoration in anorexia nervosa. *Psychiatry Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2013.05.026> (Epub ahead of print).

Kipman, A., Gorwood, P., Mouren-Siméoni, M. C., Ades, J. (1999) Genetic factors in anorexia nervosa. *Eur. Psychiatry* 14, 189-198.

Kocourková, J. et al. (1997) Mentální anorexie a mentální bulimie v dětství a dospívání, *Galén*, 43-61.

Kontis, D., Theochari, E. (2012) Dopamine in anorexia nervosa: a systematic review. *Behav. Pharm.* 23, 496-515.

Kral, A., Kovarnik, T., Kralik, L., Skalicka, H., Horak, J., Mintz, G. S., Uhrova, J., Sonka, M., Wahle, A., Downe, R., Aschermann, M., Martasek, P. and Linhart, A. (2011) Genetic variants in haem oxygenase-1 and endothelial nitric oxide synthase influence the extent and evolution of coronary artery atherosclerosis. *Folia Biologica* 57, 182-190.

Krch, F. D. (1999) Poruchy příjmu potravy, *Grada*, 248.

Krizova, J., Dolinkova, M., Lacinova, M., Sulek, S., Dolezalova, R., Housova, J., Krajickova, J., Haluzikova, D., Bosanska, L., Papezova, H., Haluzik, M. (2008) Adiponectin and resistin gene polymorphisms in patients with anorexia nervosa and obesity and its influence on metabolic phenotype. *Physiol. Res.* 57, 4. 539-546.

Kyrou, I. and Tsigos, D. (2007) Stress mechanisms and metabolic complications. *Horm. Metab. Res.* 39, 430-438.

Kyrou, I., Tsigos, C. (2009) Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr Opin Pharmacol.* 9, 787-93

LaPorte, J. L., Ren-Patterson, R. F., Murphy, D. L., Kalueff, A. V. (2008) Refining psychiatric genetics: from „mouse psychiatry“ to understanding komplex human disorders. *Behav. Pharmacol.* 19, 377-384.

Libiger J. (2005) Komentář. *Arch. Gen. Psychiatry – CS.* 3, 77-78.

Lilenfeld, L. R., Kaye, W. H., Greeno, C. G., Merikangas, K. P., Plotnicov, K., Pollice, C., Rao, R., Strober, M., Bulik, C. M., Nagy, L. (1998) A controlled familz studz of anorexia nervosa and bulimia nervosa: psychiatric disorders in first-degree relatives and effects of proband comorbidity. *Arch. Gen. Psychiatry* 157, 393-401.

Martásková D., Papežová H. (2005) Anorexie nervosa – genetické faktory, současné znalosti a možné trendy., *Česká a slovenská psychiatrie*, S1, 36-37.

Mazzeo, S. E., Mitchell, K. S., Bulik, C. M., Reichborn-Kjennerud, T., Kendler, K. S., Neale, M. C. (2009) Assessing the heritability of anorexia nervosa symptoms using a marginal maximal likelihood approach. *Psychol. Med.* 39, 463-473.

Megias, J., Busserolles, J., Alcaraz, M. (2007) The carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 inhibits the inflammatory response induced by cytokines in Caco-2 cells. *Brit. J. Pharm.* 150, 977-986.

Megias, J., Guillen, M. I., Clerigues, V., Rojo, A. I., Cuadrado, A., Castejon, M. A., Gomar, F., Alcaraz, M. J. (2009) Heme oxygenase-1 induction modulates microsomal prostaglandin E synthase-1 expression and prostaglandin E(2) production in osteoarthritic chondrocytes. *Biochem. Pharm.* 77, 1806-1813.

Méquinion, M., Langlet, F., Zgheib, S., Dickson, S., Dehouck, B., Chauveau, C., Viltart, O. (2013) Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa. *Front. Endocrinol.* 4, 15, 1-27.

Mercader, J.M., Ribasés, M., Gratacòs, M., González, J.R., Bayés, M., de Cid, R., Badía, A., Fernández-Aranda, F., Estivill, X. (2007) Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia. *Genes Brain Behav.* 6, 706-716.

Minov , C., Baghai, T. C., Schüle, C., Zwanzger, P., Schwarz, M. J., Zill, P., Rupprecht, R., Bondy, B. (2001) Serotonin -2A- receptor and -transporter polymorphism: lack of association in patients with major depression. *Neurosci. Lett.* 303, 119-122.

Monteleone, P., Maj, M. (2008) Genetic susceptibility to eating disorders: associated polymorphisms and pharmacogenetic suggestions. *Pharmacogenomics* 9, 1487-1520.

Murphy G. (2004) Effects of the serotonin transporter gene promoter polymorphism on Mirtazapin and Paroxetine efficacy and adverse events in geriatric major depression., *Arch. Gen. Psychiatry* 61, 1163-1169.

Murphy, D. L., Fox, M. A., Timpano, K. R., Moya P. R., Ren-Patterson R., Andrews, A. M., Holmes, A., Lesch K-P., Wendland J. R. (2008) How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology* 55, 932-960.

Nacmias, B., Ricca, V., Tedde, A., Mezzani, B., Rotella, C. M., Sorbi, S. (1999) 5-HT2A promoter polymorphisms in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Neurosci. Lett.* 277, 134-136.

Nagata, T., Matsuyama, M., Kiriike, N., Iketani, T., Oshima, J. (2000) Stress coping strategy in Japanese patients with eating disorders - Relationship with bulimic and impulsive behaviors. *J. Ner. Ment. Dis.* 188, 280-286.

Nischiguchi, N., Matsushita, S., Suzuki, K., Muruyama, M., Shirakawa, O., Higuchi, S. (2001) Association between 5HT2A receptor gene promoter polymorphisms and eating disorders in Japanese patients. *Biol. Psychiatry* 50, 123-128.

Otterbein, L., Bach, F. H., Alam, J. Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R.J., Flavell, R.A., Choi, A.M. (2000) Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6, 422-428.

Papežová, H. (1997) Poruchy příjmu potravy. *Čes. A slov. Psychiatrie*, S4, 69-76.

Patterson, Z. R., Abizaid, A. (2013) Stress induced obesity: lessons from rodent models of stress. *Front Neurosci* 7,130, 1- 20.

Pavlova, B. (2010). In Papezova, H. Spectrum of eating disorders. *Grada*, 36-35.

Poss, K. D. and Tonegawa, S. (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94, 10919-10924.

Purcell, S., Cherny, S. S., Sham, P. C. (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19, 149-150.

Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I., Daly, M. J., Sham, P. C. (2007) PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 559-575.

Rahe, R. H., Mahan, J. L., Jr. Arthur, R. J. (1970). Prediction of near-future health change from subjects' preceding life changes. *J. Psychosom. Res.* 14(4), 401-6.

Rahe, R. H. et al. (1972). Psychosocial predictors of illness behavior and failure in stressful training. *J. Health Soc. Behav.* 13(4), 393-97.

Rahe, R. H., Arthur, R. J. (1978). Life change and illness studies: past history and future directions. *J. Human Stress* 4(1), 3-15.

Rahe, R., TL, V., RL, T. K, M. (2000) The stress and coping inventory: an educational and research instrument. *Stress Med.* 16, 199-208.

Ramoz, N., Versini, A., Gorwood, P. (2007) Eating disorders: an overview of treatment responses and the potential impact of vulnerability genes and endophenotypes. *Expert Opin. Pharmacother.* 8, 1-16.

Ribasés, M., Gratacòs, M., Fernández-Aranda, F., Bellodi, L., Boni, C., Anderluh, M., Cristina Cavallini, M., Cellini, E., Di Bella, D., Erzegovesi, S., Foulon, C., Gabrovsek, M., Gorwood, P., Hebebrand, J., Hinney, A., Holliday, J., Hu, X., Karwautz, A., Kipman, A., Kolem, R., Nacmias, B., Remschmidt, H., Ricca, V., Sorbi, S., Tomori, M., Wagner, G., Treasure, J., Collier, D.A., Estivill, X. (2005) Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations. *Eur J Hum Genet.* 13, 428-434.

Ricca, V., Nacmias, B., Boldrini, M., Cellini, E., di Bernardo, M., Ravaldi, C., Tedde, A., Bagnoli, S., Placidi, G. F., Rotella, C.M., Sorbi, S. (2004) Psychopathological traits and 5-HT<sub>2A</sub> receptor promoter polymorphism (-1438 G/A) in patients suffering from Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa. *Neurosci. Lett.* 365, 92-96.

Rizvi, S. I., Peterson, C., Crow, S., Agras, W. (2000) Test-retest reliability of the eating disorder examination. *Int. J. Eat. Dis.* 28, 311-316.

Root, T. L., Szatkiewicz, J. P., Jonassaint, C. R., Thornton, L. M., Pinheiro, A. P., Strober, M., Bloss, C., Berrettini, W., Schork, N. J., Kaye, W. H., Bergen, A. W., Magistretti, P., Brandt, H., Crawford, S., Crow, S., Fichter, M. M., Goldman, D., Halmi, K. A., Johnson, C., Kaplan, A. S., Keel, P. K., Klump, K. L., La Via, M., Mitchell, J. E., Rotondo, A., Treasure, J., Woodside, D. B., Bulik, C. M. (2011) Association of candidate genes with phenotypic traits relevant to anorexia nervosa. *Eur. Eat. Disord. Rev.* 19, 487-493.

Rueda, B., Oliver, J., Robledo, G., Lopez-Nevot, M. A., Balsa, A., Pascual-Salcedo, D., Gonzalez-Gay, M. A., Gonzalez-Escribano, M. F., Martin, J. (2007) HO-1 promoter polymorphism associated with rheumatoid arthritis. *Arthr. Rheum.* 56, 3953-3958.



Russell, G. (1997) The present status of anorexia nervosa. *Psychol. Med.* 7, 353-367.

Rybakowski, F., Slopian, A., Dmitrzak-Weglarz, M., Czerski, P., Rajewski, A., Hauser, J. (2006) The 5-HT2A -1438 A/G and 5-HTTLPR polymorphisms and personality dimensions in adolescent anorexia nervosa: association study. *Neuropsychobiology* 53, 33-39.

Sachs-Ericsson, N., Keel, P.K., Holland, L., Selby, E.A., Verona, E., Coughle, J.R., Palmer, E. (2012) Parental disorders, childhood abuse, and binge eating in a large community sample. *Int. J. Eat. Dis.* 45, 316-325.

Serretti, A., Drago, A., De Ronchi, D. (2007) HTR2A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. *Curr. Med. Chem.* 14, 2053-2069.

Scherag, S., Hebebrand, J., Hinney, A. (2010) Eating disorders: the current status of molecular genetic research. *Eur. Child Adolesc. Psych.* 19, 211-226.

Shibahara, S., Muller, R.M. and Taguchi, H. (1987) Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J. Biol. Chem.* 262, 12889-12892.

Shugart, Y.Y., Chen, L., Day, I.N., Lewis, S.J., Timpson, N.J., Yuan, W., Abdollahi, M.R., Ring, S.M., Ebrahim, S., Golding, J., Lawlor, D.A., Davey-Smith, G. (2009) Two British women studies replicated the association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and BMI. *Eur J Hum Genet.* 17, 1050-1055.

Schillinger, M., Exner, M., Minar, E., Mlekusch, W., Mullner, M., Mannhalter, C., Bach, F.H., Wagner, O. (2004) Heme oxygenase-1 genotype and restenosis after balloon angioplasty: a novel vascular protective factor. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 43, 950-957.

Skrzypek, S., Wehmeier, P. M., Remschmidt, H. (2001) Body image assessment using body size estimation in recent studies on anorexia nervosa. *Eur. Child Adolesc. Psych.* 10, 215-21.

Smitka K., Papezova H., Vondra K., Hill M., Hainer V., Nedvidkova J. (2011) A higher response of plasma neuropeptide Y, growth hormone, leptin levels and extracellular glycerol levels in subcutaneous abdominal adipose tissue to Acipimox during exercise in patients with bulimia nervosa: single-blind, randomized, microdialysis study. *Nutrition & Metabolism*, 8:81.

Sorbi, S., Nacmias, B., Ricca, V., Tedde, A., Mezzani, B., Rotella, C.M. (1998) 5-HT2A promoter polymorphism in anorexia nervosa. *Lancet* 351, 1785-1785.

Sorlí, J.V., Francés, F., Gonzáles, J.I., Guillén, M., Portolés, O., Sabater, A., Coltell, O., Corella, D. (2008) Impact of the -1438 G>A polymorphism in the serotonin 2A receptor gene on anthropometric profile and obesity risk: A case-control study in a Spanish Mediterranean population. *Appetite* 50, 260-265.

Strober, M., Lampert, C., Morrell, W., Burroughs, J., Jacobs, C. (1990) A controlled family study of anorexia nervosa: Evidence of familial aggregation and lack of shared transmission with affective disorders. *Int. J. Eat. Disord.* 9, 239-253.

Sulek, S., Lacinová, Z., Dolinková, M., Haluzik, M. (2007) Genetic polymorphisms as a risk factor for anorexia nervosa. *Prague Med. Rep.* 108, 215-225.

Sullivan P.F. (1995) Mortality in anorexia nervosa. *Am. J. Psychiatry* 152, 1073-1074.

Sundaramurthy, D., Pieri, L. F., Gape, H., Markham, A. F., Campbell, D. A. (2000) Analysis of the serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) in anorexia nervosa. *Am. J. Med. Genet.* 96, 53-55.

Taha, H., Skrzypek, K., Guevara, I., Nigisch, A., Mustafa, S., Grochot-Przeczek, A., Ferdek, P., Was, H., Kotlinowski, J., Kozakowska, M., Balcerczyk, A., Muchova, L., Vitek, L., Weigel, G., Dulak, J. and Jozkowicz, A. (2010) Role of heme oxygenase-1

in human endothelial cells: lesson from the promoter allelic variants. *Arterioscler. Thromb Vasc.Biol.* 30, 1634-1641.

Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61, 748-755.

Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R. (1969) Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244, 6388-6394.

Theander, S. (1970) Anorexia nervosa: a psychiatric investigation of 94 female patients. *Acta Psych. Scand.* S214, 1-194.

Thoenen, H. (2005) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270, 593-598.

Trace, S.E., Baker, J.H., Penas-Lledó, E., Bulik, C.M. (2013) The genetics of eating disorders. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 9, 589-620.

Wade, T.D., Treloar, S.A., Heath, A.C., Martin, N.G. (2009) An examination of the overlap between genetic and environmental risk factors for intentional weight loss and overeating. *Int. J. Eat. Dis.* 42, 492-497.

Waters, B. G. H., Beumont, P. J. V. (1990) Behavioral differences between twin and non-twin female sibling pairs discordant for anorexia nervosa. *Int. J. Eat. Disord.* 9, 265-273.

Weis, S., Jesinghaus, M., Kovacs, P., Schleinitz, D., Schober, R., Ruffert, C., Herms, M., Wittenburg, H., Stumvoll, M., Bluher, M., Grutzmann, R., Schulz, H.U., Keim, V., Mossner, J., Bugert, P., Witt, H., Drenth, J.P., Krohn, K., Rosendahl, J. (2012) Genetic analyses of heme oxygenase 1 (HMOX1) in different forms of pancreatitis, *PloS One* 7, e37981.

Yamada, N., Yamaya, M., Okinaga, S., Nakayama, K., Sekizawa, K., Shibahara, S., Sasaki, H. (2000) Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene

promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 187-195.

Ying, S., Liu, X.M., Pan S.H. (2009) Genetic polymorphism c.1438A>G of the 5-HT2A receptor is associated with abdominal obesity in Chinese Northern Han population. *Mol. Biol. Rep.* 36, 91-95.

Ziegler, A., Hebebrand, J., Gorg, T., Rosenkranz, K., Fichter, M., Herpertz-Dahlmann, B., Remschmidt, H., Hinney, A. (1999) Further lack of association between the 5-HT2A gene promoter polymorphism and susceptibility to eating disorders and a meta-analysis pertaining to anorexia nervosa. *Mol. Psychiatry* 4, 410-412.

Žuchová, S. (2009) The relation between neuropsychological characteristics and clinical status of anorexia nervosa patients, PhD Thesis, 1st Medical Faculty, Charles University, Prague

## **10. PŘÍLOHY**

## **10. 1. PŘÍLOHA 1**

### **Dotazník EDE-Q**

## 10.1. Dotazník EDE-Q

### Osobní údaje

Jméno:

Rodné číslo:

ID:

Datum odběru:

Potýkám se s:

anorexia nervosa

bulimia

jiné

### Socio-epidemiologické údaje

Pohlaví:

Věk: vzorec

Váha:

Výška:

BMI: vzorec

Stav:

Děti:

Vzdělání: pozn. Uveďte nejvyšší dosažené

Bydlení:

Žiji ve městě / obci s:

milión obyvatel	méně než milión	50 000 –	5 000 –	méně než
a více	a více než 100 000	99 999 obyvatel	49 999 obyvatel	5 000 obyvatel
	obyvatel			

Žil/a jste někdy alespoň 2 měsíce v zahraničí: Ano/ Ne

Ano => Kolik vám bylo let? Jak dlouhý byl pobyt? Důvod

Žil/a jste někdy alespoň 2 měsíce odděleně od rodičů? Ano/Ne

Ano => Kolik vám bylo let? Jak dlouho? Důvod?

### Zdravotní návyky:

Kouřím: Ano/ne kolik denně

Alkohol:

Sport: Ano/ne h týdně

## Část I.

Následující otázky se týkají pouze předchozích 4 týdnů (28 dní). Odpovězte, prosím, na všechny otázky.

### V kolika z posledních 28 dnů se stalo, že.....?

Nikdy 1-5 dnů 6-12 dnů 13-15 dnů 16-22dnů 23-27dnů každý den

1. Snažila jste se záměrně omezit množství jídla, které jíte, abyste ovlivnila svou váhu nebo postavu? (ať už se Vám to dařilo nebo ne).
2. Delší dobu (alespoň 8 hodin za dobu, kdy jste byla vzhůru) jste vůbec nic nejedla, abyste ovlivnila svou váhu nebo postavu
3. Snažila jste se ze své stravy vyloučit některá jídla, která máte ráda kvůli ovlivnění své váhy či postavy? (ať už se Vám to dařilo nebo ne).
4. Snažila jste se v jídle dodržovat určitá pravidla (např. Nepřekročit určité množství kalorií) kvůli ovlivnění své váhy či postavy? (ať už se Vám to dařilo nebo ne).
5. Velice jste si přála mít prázdný žaludek, abyste ovlivnila svou postavu nebo váhu?
6. Velice jste si přála, aby Vaše břicho bylo úplně ploché?
7. Zaměstnávaly Vás myšlenky na jídlo, jezení či kalorie natolik, že jste se nemohla soustředit na činnosti, které Vás zajímají (práci, rozhovor, čtení, zábavu)?
8. Zaměstnávaly Vás myšlenky na Vaši postavu či tělesnou hmotnost natolik, že jste se nemohla soustředit na činnosti, které Vás zajímají (práci, rozhovor, čtení, zábavu)?
9. Intenzivně jste se obávala, že ztratíte kontrolu nad jídlem?
10. Intenzivně jste se obávala, že byste mohla přibrat na váze?
11. Připadala jste si tlustá?
12. Velice jste si přála zhubnout?

### Kolikrát za poslední 4 týdny se Vám stalo, že?

13. Jste snědla takové množství jídla, které by jiní lidé za daných okolností považovali za neobvykle velké?
14. Při kolika z těchto příležitostí jste cítila, že jste nad jídlem ztratila kontrolu (ve chvíli, kdy jste jedla)?
15. V kolika z posledních 28 dní jste se tímto způsobem přejedla?
16. jste si přivodila zvracení za účelem kontroly tělesné hmotnosti a postavy?
17. jste si vzala projímadlo jako prostředek ke kontrole tělesné hmotnosti a postavy?
18. jste nutkavě cvičila za účelem kontroly tělesné hmotnosti a postavy nebo abyste spálila kalorie?

V následujících otázkách **vyberte některou z nabízených možností**. Otázky se opět týkají pouze posledních 4 týdnů. Záchvaty přejídáním rozumíme jedení takového množství jídla, které by ostatní za daných okolností pokládali za neobvykle velké, doprovázené pocitem, že jste nad jídlem ztratila kontrolu.

19. V kolika z posledních 28 dnů jste jedla potají? (mimo záchvaty přejídání)



- Nikdy 1-5 dnů 6-12 dnů 13-15 dnů 16-22dnů 23-27dnů každý den
20. Jak často se Vám při jídle stalo, že jste měla pocit viny za následky, které to bude mít pro Vaši postavu nebo váhu? (mimo záchvaty přejídání).
- Nikdy Několikrát Méně než v polovině případů V polovině případů Více než v polovině případů Většinou Pokaždé

**K následujícím otázkám zaškrtněte možnosti:**

vůbec ne                      málo                      mírně                      výrazně

21. Nakolik Vás během posledních 28 dnů znepokojovalo, že by Vás ostatní viděli jíst?
22. Měla Vaše tělesná hmotnost vliv na to, jak sama sebe vnímáte a hodnotíte?
23. Měla Vaše postava vliv na to, jak sama sebe vnímáte a hodnotíte?
24. Do jaké míry by Vás znepokojilo, kdybyste se měla vážit jedno týdně (ne víckrát, ne méněkrát) po následující 4 týdny?
25. Nakolik jste byla nespokojená se svou váhou?
26. Nakolik jste byla nespokojená se svou postavou?
27. Nakolik Vás znepokojovalo, když jste viděla vlastní tělo (například v zrcadle, při převlékání, ve sprše, odraz ve výloze)?
28. Nakolik Vás znepokojovalo, že by někdo jiný viděl Vaše tělo (například ve veřejných šatnách, na plovárně nebo v přiléhavých šatech)?

Vynechala Vám během posledních tří měsíců menstruace?

Pokud ano, kolikrát?

Užívala jste hormonální antikoncepci?

**Část II.**

Tato část dotazníku se týká Vaší minulosti. Pokud si přesně nevzpomínáte, pokuste se prosím o co nejpřesnější odhad.

1. Kdy jste dorostla do své současné výšky? .....let
2. Jaká byla Vaše nejvyšší tělesná hmotnost od doby, kdy jste dorostla své současné výšky do Vašich 18ti let? .....kg ve věku.....let
3. Jaká byla Vaše nejnižší tělesná hmotnost od doby, kdy jste dorostla své současné výšky do Vašich 18ti let? .....kg ve věku.....let
4. Jaká byla Vaše nejvyšší tělesná hmotnost od Vašich 18ti let do současnosti? .....kg ve věku.....let
5. Jaká byla Vaše nejnižší tělesná hmotnost od Vašich 18ti let do současnosti? .....kg ve věku.....let
6. Kdy jste začala poprvé menstruat? Ve věku.....let                      nikdy
7. Kdy jste poté začala menstruat pravidelně? (3x za cca 3 měsíce)  
ve věku.... let                      nikdy
8. Stalo se Vám od té doby, že jste alespoň 3 měsíce neměla menstruaci?  
ano/ne
9. Pokud ano, kdy to bylo poprvé?                      **od-do**                      Ve věku.....let..... měsíců
10. A kdy ještě?                      **od-do**                      Ve věku.....let..... měsíců
11. Brala jste hormonální antikoncepci? ano/ne
12. Pokud ano, kdy?                      **od-do**                      ve věku.....let..... měsíců
13. Držela jste někdy dietu za účelem snížení nebo udržení Vaší tělesné hmotnosti? ano/ne

14. Pokud ano, kdy jste takovou dietu držela poprvé? **od-do** ve věku.....let..... měsíců
15. Kdy ještě? **od-do** ve věku.....let..... měsíců
16. Kdy naposled? **od-do** ve věku.....let..... měsíců
17. Stalo se Vám někdy, jste snědla takové množství jídla, které by jiní lidé za daných okolností považovali za neobvykle velké a měla jste při tom pocit, že jste ztratila nad jídlem kontrolu? ano/ne
18. Pokud ano, kdy se to stalo poprvé ve věku.....let.....měsíců
19. Kdy jste se poprvé začala takto přejídat alespoň 2x týdně? ve věku.....let..... měsíců
20. A kdy naposled? ve věku.....let..... měsíců
21. Cvičila jste někdy intenzivně za účelem kontroly Vaší tělesné váhy nebo postavy? ano/ne
22. Pokud ano, kdy se to stalo poprvé ve věku.....let..... měsíců
23. Kdy jste poprvé začala cvičit alespoň 5 hodin týdně? ve věku..... let..... měsíců/ nikdy
24. Kdy jste takto cvičila nejčastěji? **od-do** věku....let..... měsíců .. hodin/týden
25. Kdy jste takto cvičila naposled? ve věku....let.....měsíců... hodin/týden
26. Způsobovala jste si někdy zvracení za účelem kontroly Vaší tělesné váhy nebo postavy? ano/ne
27. Pokud ano, kdy se to stalo poprvé? ve věku....let..... měsíců
28. Kdy jste poprvé začala zvracet alespoň 2x týdně? ve věku.....let..... měsíců/nikdy
29. Kdy nejčastěji? ve věku.....let..... měsíců
30. A kdy naposled? ve věku.....let..... měsíců
31. Brala jste si někdy léky za účelem kontroly Vaší tělesné váhy nebo postavy? ano/ne projímadla/diuretika/jiné.....(specifikujte)
32. Pokud ano, kdy se to stalo poprvé? ve věku.....let..... měsíců
33. Kdy jste tyto léky brala nejčastěji? **Od- do** věku.....let.....měsíců
34. A kdy naposled? Ve věku.....let.. .. měsíců
35. Užívala jste někdy alkohol v takové míře, že to narušilo Vaše vztahy k ostatním lidem, pracovní kariéru nebo školní prospěch? ano/ne
36. Pokud ano, kdy se to stalo poprvé? ve věku.....let.....měsíců
37. Kdy jste se začala opíjet alespoň 2x týdně? ve věku.....let... měsíců /nikdy
38. Kdy jste pila alkohol nejvíce? **Od- do** věku.....let.....měsíců množství..... ..krát za týden
39. A kdy naposled? **Od- do** věku.....let..... měsíců množství..... ..krát za týden
40. Užívala jste někdy drogy (jiné než alkohol) v takové míře, že to narušilo vaše vztahy k ostatním lidem, pracovní kariéru nebo školní prospěch? ano/ne jaké?.....
41. Pokud ano, kdy se to stalo poprvé? Ve věku.....let.....měsíců
42. Kdy jste drogu užívala nejvíce? **Od- do** věku.....let.....měsíců množství.....krát za týden
43. A kdy naposled? **Od- do** věku.....let.....měsíců množství..... ..krát za týden
44. Způsobovala jste si někdy záměrně bolest či zranění? ano/ne
45. Pokud ano, jak?  
 Řezáním pálením uhozením/bitím škrcením pouštěním žilou  
 škrábáním bodáním kousáním trhání vlasů jinak.....

46. Pokud ano, kdy se to stalo poprvé?      ve věku.....let..... měsíců  
.....krát za měsíc
47. A kdy jindy?      **Od- do** věku.....let.....měsíců  
. ....krát za měsíc
48. Kdy naposled? ve věku.....let..... měsíců .....krát za měsíc
49. Pokusila jste se někdy o sebevraždu? ano/ne
50. Pokud ano, kdy? Ve věku.....způsob

## **10. 2. PŘÍLOHA 2**

### **Dotazník stressových situací Rahe**

## 10.2. Dotazník stressových situací Rahe

Hodnocení stresových situací	ano/ne	ve věku	body
1. Smrt partnera nebo rodiče			100
2. Rozvod (váš nebo vašich rodičů)			65
3. Puberta			65
4. Těhotenství (nebo vámi způsobené těhotenství)			65
5. Rozvod rodičů nebo rozchod s partnerem			60
6. Uvěznění			60
7. Smrt blízkého člena rodiny (ne rodiče)			60
8. Zrušení vašeho zasnoubení			55
9. Zasnoubení			50
10. Vážná nemoc nebo úraz			45
11. Svatba			45
12. Začátek vysoké školy nebo dalšího stupně vzdělávání			45
13. Změna v nezávislosti nebo odpovědnosti			45
14. Jakékoli používání drog nebo alkoholu			45
15. Propuštění z práce nebo vyhození ze školy			45
16. Změna vpoužívání drog nebo alkoholu			45
17. Usmíření se s kamarádem, rodinou, nebo partnerem (návrat do vztahu / do rodinných vztahů)			40
18. Problémy ve škole			40
19. Vážné onemocnění člena rodiny			40
20. Práce zároveň se studiem			35
21. Pracovní doba víc jak 40 hodin týdně			35
22. Změna oboru studia			35
23. Změna ve frekvenci schůzek s přítelem/ přítelkyní			35
24. Sexuální problémy (nejistota v sexuální identitě)			35
25. Získání nového člena rodiny (narození dítěte nebo rodič se znovu oženil/ vdala)			35
26. Změna v pracovní odpovědnosti			35
27. Změna finanční situace			30
28. Smrt blízkého přítele (ne člena rodiny)			30
29. Změna na jiný typ zaměstnání			30
30. Změna ve frekvenci hádek s přítelem, rodinou, nebo partnerem			30
31. Míň jak 8 hodin spánku za noc			25
32. Potíže s příbuznými partnera			25
33. Výjimečný osobní výkon (ocenění, známky, apod.)			25
34. Partner či rodič začíná/ přestává chodit do práce			20
35. Začátek/ konec školy			20
36. Změna v podmínkách bydlení (návštěva, přestavba, změna ve spolubydlících)			20
37. Změna v návycích (začal/a nebo přestala jste kouřit, s dietou)			20
38. Chronické alergie			20

39. Problémy s nadřazeným	20
40. Změna pracovní doby	15
41. Změna bydliště	15
42. Změna školy (ne z důvodu ukončení studia)	10
43. Průběh premenstruačního období	15
44. Změna náboženské aktivity	15
45. Zadlužení (vy nebo vaše rodina)	10
46. Změna ve frekvenci rodinných setkávání	10
47. Dovolená/ volno	10
48. Průběh vánočních svátků	10
49. Menší porušení zákona	5

**Prosím uveďte tři nejzávažnější události:**

- 1)
- 2)
- 3)

### 10. 3. PŘÍLOHA 3

Papezova H, Slachtova L, **Martaskova D**, Yamamotova A, Martasek P: Pathologic self-perception and G196A polymorphisms in BDNF gene in patients with eating disorders. 10<sup>th</sup> World Congress of Biological Psychiatry (WFSBP 2011). Prague, Czech Republic, May 29 – Jun 2, 2011.

# Body and Brain. Pathologic Body perception and BDNF polymorphism in patients with eating disorders

Papežová, H2, Šlachťová, L1, Martásková, D2, Martásek, P1, Yamamotová, A3,

1Department of Pediatrics and Adolescent Medicine and 2Department of Psychiatry, 1st Faculty of Medicine, 3Department of Normal, Pathological and Clinical Physiology, 3rd Faculty of Medicine, Charles University, Prague, Czech Republic

## Abstract

Eating disorders (ED), especially Anorexia Nervosa (AN), are the serious psychiatric disorders characterized by pathological eating pattern and one's own body perception, inability to maintain stable normal body weight and obsessive fear of becoming overweight. The clear genetic component of these multifactorial diseases has been observed. In the context of neurotransmitter serotonin and dopamine pathways, the G196A polymorphism in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene has been investigated.

BDNF is responsible for normal expression of dopamine D3 receptors in nucleus accumbens which affect the behavior sensitivity including anxiety and distorted body perception. The DNA samples, stress and EDE-Q questionnaires of 110 patients with anorexia nervosa and matching controls were analysed. Mann-Whitney test for the calculation of BDNF genotype and pathologic self-perfection has been used with the significant results for G/A genotype in self-perfection focused questions. Here we demonstrate, that G196A polymorphism in BDNF gene may be associated with the pathological self-perfection in patients with eating disorders.

**AIM** of the study is to show, how clinical and genetic correlates involve pathological (anxious) ones own body perception.

## Introduction

**Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)** is a prosurvival factor responsible for neuron proliferation, differentiation and survival, through its uptake at nerve terminals and retrograde transport to the cell body.

BDNF from dopamine neurons is responsible for inducing normal expression of the dopamine D3 receptor in nucleus accumbens both during development and in adulthood. BDNF from corticostriatal neurons also induces behavioural sensitization, by triggering overexpression of the D3 receptor in striatum (1). G196A polymorphism in BDNF gene leads to aminoacid changes. Val66Met is associated with different disorders including memory impairment, obsessive-compulsive disorder and eating disorders including anorexia and bulimia nervosa.

Abnormal hippocampal activation and lower hippocampal n-acetyl aspartate in G196A variant was assayed with MRI spectroscopy. Egan et al suggest, that val66met effects intracellular trafficking, folding and releasing BDNF protein in vitro (2). Knock-in mice model of G196A variant of BDNF gene reveals the similarity with the human phenotype and it is associated with anxiety behaviour or defected extinction on negative experience.

During the remission in anorexia nervosa patients there is positive correlation in D2/D3 connections (in dorsal caudatus and putamen) and persisting anxiety (3). In eating disorders, lasting anxiety is often connected with the negative one's own body perception.

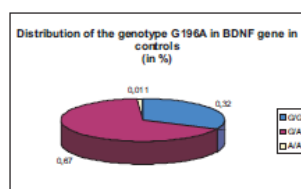
## Literature

1. Gullin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P. BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* 2001; 341(6833): 86-9.
2. Egan, M. F., Kojima, M., Callicott, J. H., Goldberg, T. E., Kolachana, B. S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., Weinberger, D. R. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112: 257-269, 2003.
3. Frank G, Baier UF, Henry S, Drevets W, Meltzer CG, Price JC, Mathis C, Wagner A, Hoge J, Zolko SK, Barabach N, Weissfeld L, Kaye W: Increased dopamine D2/D3 receptor binding after recovery from anorexia nervosa measured by positron emission tomography and [<sup>11</sup>C]raclopride. *Biol Psychiatry* 2005; 58:908-912
4. Soliman F, Glat ChE, Bath KG, Levita L, Jones RM, Pattwell SP, Jing D, Tottenham N, Amso D, Somerville LH, Voss HU, Glover G, Ballon DJ, Liston C, Teslovich T, Van Kempen T, Lee FS, Casey BJ: A Genetic Variant BDNF Polymorphism Alters Extinction Learning in Both Mouse and Human. *Science*. 327:12
5. Martásková D, Šlachťová L, Kemlík D, Žahoráková D, Papežová H: Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analysis with previously performed studies. *Folia biologica* 2009
6. Chou CH, Tsai CH, Lee CH, Lin S, Tsai F: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphism in febrile seizures. *Epilepsy Research* 2004 (60): 27-29

## Results

For G196A variant the pair comparison of G/A and G/G genotypes was used because of the low presence of A/A variant.

The Mann-Whitney test was used. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups are shown in the table (Table 1). Genotype distribution in patients and in controls is shown in the graphs.



**Tab. 2 - Correlation of stress index with selected items from EDE-Q**  
\* $p < 0.05$

	Total	Patients	Controls
Stress Index			
8 Thinking about shape and weight	.292*	.372*	-0.038
21 Concerns to be seen during the eating	.326*	0.227	0.129
22 Influence of the weight on self-assessment	.206*	0.172	0.066
25 Dissatisfaction with one's own weight	.206*	0.079	0.154
26 Dissatisfaction with one's own shape	.241*	0.134	0.091
27 Uncomfortable seeing one's own figure	.228*	0.116	0.094
28 Uncomfortable when others see one's own figure	.235*	0.052	0.202

## Methods

In patients from the Center for patients with eating disorders (N=113, AVG age 26 yrs) with anorexia and bulimia nervosa and control group of identical population and age the correlates between characteristic one's own body perception (EDE-Q), stress range and genetic polymorphisms (brain-derived neurotrophic factor, BDNF). Genetic analyses were performed from the genomic DNA of the probands according to the standard rules of Ethic Committee after the signature of Informed Content as the agreement with the project participation. Analyses were performed via PCR reaction followed by restriction according to Chou et al. PCR products were cutted by restriction enzyme NlaIII, products were separated and then visualized by Gel Red. For the statistical analyses Mann Whitney was used.

**Tab.1 Differences in BDNF genotype correlation and pathological one's own body perception (according to EDE-Questions)**

	8 Thinking about shape and weight	21 Concerns to be seen during the eating	22 Influence of the weight on self-assessment	25 Dissatisfaction with one's own weight	26 Dissatisfaction with one's own shape	27 Uncomfortable seeing one's own figure	28 Uncomfortable when others see one's own figure
Mann-Whitney U	691	541.5	50	539.5	531.5	431	525.5
Wilcoxon W	2703	2599.5	2598	2492.5	2422.5	2447	2545.5
Z	-0.945	-2.294	-2.583	-2.282	-2.275	-3.411	-2.538
Asymp. Sig. (2-tailed)	0.345	0.022	0.01	0.022	0.023	0.001	0.011

## Conclusion

BDNF plays important role in pathophysiology in many disorders - drug abuse, schizophrenia, Parkinson disease with normal expression of D3 receptors. Our pre-results show, that BDNF could be involved in specific symptomatology of one's own body perception anxiety and negative life experiences in patients with eating disorders.

Supported by grants IGA MZ NS/10045-4 a VZ 21620616







